ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. X No 3

1 9 6 1

PRZEPISY AUTORSKIE

Jako materiał publikacyjny mogą być nadsyłane rozprawy i komunikaty dotyczące prac oryginalnych z dziedziny mikrobiologii ogólnej, rolniczej i przemysłowej, nigdzie dotychczas nie publikowane, a referowane uprzednio na posiedzeniu Oddziału Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów lub innego towarzystwa naukowego. Czasopismo zamieszcza również referaty przeglądowe.

Jednostronne maszynopisy o podwójnych odstępach, z marginesem 4 cm należy przesyłać w 2 egz. na ręce sekretarza: Redakcja „*Acta Microbiologica Polonica*", Warszawa, Nowy Świat 67.

Do prac pisanych po polsku należy dołączyć streszczenie rosyjskie, angielskie, francuskie lub niemieckie. Streszczenia powinny zawierać zasadnicze konkluzje pracy i nie powinny przekraczać 15% tekstu. Prace w obcym języku (rosyjski, angielski, francuski lub niemiecki) muszą być uprzednio akceptowane przez tłumacza Redakcji; należy do nich dołączyć wersję polską i streszczenie w języku polskim. Każda praca powinna być zaopatrzona w tytuł w języku polskim oraz streszczenia, nazwisko i inicjały autora(ów), nazwę i adres zakładu, w którym wykonano pracę.

Pożądany jest następujący układ prac: a) krótki wstęp, b) metody badania, c) wyniki, d) dyskusja i wnioski, e) krótkie streszczenie w języku polskim — nie więcej niż 3% tekstu, f) piśmiennictwo, g) streszczenie obcojęzyczne.

Prace należy ujmować treściwie, wstęp powinien zawierać tylko dane bezpośrednio odnoszące się do opracowanego tematu; metody należy opisać krótko: tam, gdzie to możliwe powoływać się na oryginalne opisy metod.

Wyniki mogą być ilustrowane tablicami i wykresami, należy jednak unikać tablic i wykresów dla przedstawienia tych samych danych. Wykresy i tablice powinny być możliwie przejrzyste i nieskomplikowane i ilustrować zasadnicze, istotne wyniki. Rysunki i wykresy można dostarczać w czytelnych szkicach ołówkowych na brystolu, każdy na oddzielnej kartce, zaopatrzonej na odwrocie w wypisane ołówkiem: tytuł pracy, nazwisko autora oraz numer rysunku lub wykresu. Objaśnienia do rysunków i wykresów należy dołączyć na osobnej kartce z wyraźnym zaznaczeniem numeru rysunku (wykresu). W objaśnieniach należy podawać skalę lub wielokrotność powiększenia. Fotografie powinny być kontrastowe, na matowym papierze. Ilość tablic i rysunków musi być ograniczona do minimum.

W maszynopisie należy zaznaczyć miejsce, w którym ma być umieszczony rysunek (wykres, fotografia).

Przy powoływaniu się na piśmiennictwo należy podać nazwiska autorów i rok publikacji, np. Prażmowski (1879) lub (Prażmowski 1879). Jeżeli praca cytuje więcej niż jedną publikację danego autora z tego samego roku, należy to uwidocznić dodając małe litery (np. 1887 a, 1887 b itd.).

Wykaz cytowanych prac (piśmiennictwo) powinien być sporządzony w układzie alfabetycznym i powinien zawierać następujące elementy: nazwisko i inicjały autora(ów), kropka, rok, dwukropek, tytuł pracy, nazwa czasopisma w przyjętych skrótach, tom (ewentualnie zeszyt), stronica czasopisma; w wypadku cytowania książki: nazwisko i inicjały autora(ów), rok wydania, tytuł książki, wydanie, miejsce i wydawca, ewentualnie stronica tekstu.

W tekście i tablicach należy stosować przyjęte skróty, np. ml — a nie ccm, g — a nie gr, 100° — a nie 100°C, M — molarny, N — normalny itd.

Przy opisie roztworów należy rozróżnić „%" — g na 100 g roztworu, „% objętościowy" — ml na 100 ml roztworu, „stężenie procentowe" — g na 100 ml rozpuszczalnika.

Nazwy drobnoustrojów należy podawać w brzmieniu łacińskim, przy pierwszym wzmiankowaniu — w pełnym brzmieniu. Dopuszczalne jest również jednoczesne podawanie przyjętych ogólnie nazw polskich. W dalszym tekście nazwy rodzajowe (nie gatunkowe) należy skracać lub podawać tylko nazwy polskie.

Autor otrzymuje 25 odbitek bezpłatnie, 75 odbitek nie zszywanych — po cenie zryczałtowanej (około 2 zł za stronę druku).

* * *

Zgodnie z poleceniem Zarządu Głównego Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, w przyszłości prace oryginalne będą publikowane w językach kongresowych.

Zmiana ta będzie stopniowo wprowadzana w życie już w 1962 r.

W związku z powyższym objętość prac zostanie ograniczona do maksimum 1 arkusza wydawniczego. Prace mogą być nadsyłane w wersji polskiej z załączonym słownikiem stosowanych terminów fachowych w języku publikacji. Tłumaczenie w takim przypadku wykona Redakcja na koszt autora. Prace przygotowane w wersji obcej muszą uprzednio uzyskać akceptację jednego z tłumaczów Redakcji. Do wersji obcej należy dołączyć 1 egzemplarz w wersji polskiej.

POLSKIE TOWARZYSTWO MIKROBIOLOGÓW
SEKCJA MIKROBIOLOGII OGÓLNEJ, ROLNICZEJ I PRZEMYSŁOWEJ

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

microbiologia generalis,
agrobiologica et technica

Vol. X No 3

1961

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE

RADA REDAKCYJNA

Przewodniczący: Jadwiga Ziemięcka, członek rzeczywisty PAN — Lublin, Józef Heller, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Jadwiga Jakubowska — Łódź, Aniela Kozłowska — Kraków, Władysław Kunicki-Goldfinger — Warszawa, Eugeniusz Pijanowski, członek rzeczywisty PAN — Warszawa, Feliks Przesmycki — Warszawa

KOMITET REDAKCYJNY

Redaktor naczelny — Władysław Kunicki-Goldfinger
Dział rolny — J. Gołębiowska, Poznań
Dział przemysłowy — J. Jakubowska, Łódź i S. Bujak, Lublin

Zawarte w tym zeszycie prace wykonane zostały przez uczniów i współpracowników Profesora dra Kazimierza Bassalika. Prace pochodzące z Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego były prowadzone i zakończone jeszcze za życia Profesora.

Autorzy raz jeszcze pragną dać wyraz swej gorącej wdzięczności za pomoc i opiekę, jakiej im nie szczędził nieodżałowany Nauczyciel.

Zeszyt był redagowany przez Doc. A. Drozdowicza.

PAŃSTWOWE WYDAWNICTWO NAUKOWE
ODDZIAŁ WROCŁAWSKI

Nakład 1080+140 egz.	Oddano do składania 6. VI. 1961 r.
Ark. wyd. 9,75 ark. druk. 8,0	Podpisano do druku 3. X. 1961 r.
Papier druk. sat. kl. III, 80 g. 70×100	Druk ukończono w październiku 1961 r.
Cena zł. 25,—	Nr zam. 152/61. T-6.

WROCŁAWSKA DRUKARNIA NAUKOWA

Numer poświęcony pamięci Profesora Dra Kazimierza Bassalika, wybitnego uczonego, wychowawcy kilku pokoleń polskich mikrobiologów, współzałożyciela Acta Microbiologica Polonica

Kazimierz Bassalik
12. VI. 1879 — 27. VI. 1960

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 225—238

Ludmila Janota-Bassalik and *Danuta Pedyk*

ABILITY OF *FLAVOBACTERIUM EXTORQUENS* BASSALIK TO UTILIZE VARIOUS SOURCES OF CARBON WITH PARTICULAR REFERENCE TO GLUCOSE

From the Department of the Plant Physiology, University of Warsaw, Poland
Received 12th March 1961

Summary

It was confirmed that *Fl. extorquens* did not utilize glucose in the second passage in a synthetic medium with glucose. Utilization of glucose, to an insignificant extent, was observed only when bacteria were transferred from oxalate medium or from beef extract. Dicarboxylic acids influenced favourably the growth. The markedly stimulating effect of $NaHCO_3$ on the growth of the bacteria studied was recorded on formate and acetate.

The bacteria being the subject of the present investigation have their own particular history. They were isolated and described by Bassalik (1913) in one of his first papers in Switzerland, and — due to their physiological property to utilize oxalates as the sole carbon source — they became the final evidence of natural occurrence of organisms taking part at the mineralization process of oxalates.

The original strain of the "oxalatic" bacteria isolated by Bassalik was kept at the Department of Plant Physiology, University of Warsaw, Poland, till 1939, when it perished together with other valuable materials during the World War II. Janota (1948) re-isolated the same species, the material having been stored for 12 years. Both the Switzerland and the Warsaw strains have retained its basic morphological and physiological properties during the long passaging period under laboratory conditions. However, the taxonomic systematization of the bacteria has been subjected to changes since 1913; besides, various research centres have used different systematic keys. This explain why the species discussed has already been denominated under four different generic names. Bassalik adopted the generic name of *Bacillus* for the "oxalatic" bacteria iso-

lated during the period 1909-1913 when there did not yet exist any generally recognized taxonomic system, and the bacteriologists applied that of A. Fischer or Migula. On some occasions slightly curved forms may be seen alongside the straight rods when very careful microscopic observations on the bacteria are being carried out. This was recorded by Bassalik and caused Bhat and Barker (1948) to introduce the name of *Vibrio extorquens*; under this particular name, the species has been listed in the systematics of Bergey (1957). The name "*Bacillus*" had to be rejected, owing to the fact that these bacteria were rods, did not form any spores, and were Gram negative; thus, Janota (1950) substituted the generic name *Pseudomonas* for *Bacillus*. Yet, studies carried out on the pigment produced by the "*extorquens*" species showed the former to possess the characters of the xanthophilic-naphthoquinonic pigments. Accordingly to the systematics of the *Pseudomonadaceae* family proposed by Brisou (1958), the species "*extorquens*" should be ranged within the third tribe of this family, namely within the *Chromobactereae* of the *Flavobacterium* genus (Bassalik *et al.* 1960). The problem of the classification of *Fl. extorquens* has also been considered by Iyer *et al.* (1960) on the grounds of the studies they carried out on our strain in Bangalore, India. These authors suggested a new genus to cover the species *extorquens* and those related to it which, according to Iyer represented the philogenetic link connecting the *Pseudomonas* and *Arthrobacter*.

A relatively large group of micro-organisms capable of utilizing oxalate as the only carbon source is now known.

Generally speaking, these bacteria — belonging to various systematic groups — have been well studied from the morphological point of view. On the contrary, relatively scanty are the available data on their physiological properties, and especially so on their possibility to utilize other carbon sources than oxalate. Unsystematic data get from various papers seem to indicate that the "oxalatic" bacteria are characterized by at least one feature common to all of them, namely: by their insignificant growth in a medium with glucose added or by their being absolutely unable to utilize this sugar. Their abilities to utilize organic acids are more differentiated.

Bassalik (1913) pointed out that *extorquens* was able to grow only slightly in a medium with glucose. According to Bassalik, except oxalate, the following compounds may be used as carbon source by this bacteria: formate, lactate, malonate, succinate, oxaminate, oxamid, mesoxalate, fumarate, maleinate, malate, glyoxalate, formaldehyde, methanol, ethanol, glycerol, diluted phenol, urea and alloxan, while acetate, propionate and citrate are not utilized.

V. oxaliticus, isolated and described by Bhat and Barker (1948), cannot utilize glucose, butyrate, citrate, lactate, malate, malonate, succinate and tartarate. In a mineral medium, this bacterium utilizes only oxalate, pyruvate, and acetate following a relatively long period of adaptation, while formate is utilized only when yeast extract is present.

Six strains belong to the species *Pseudomonas oxalatica* described by Khambata and Bhat (1953). Two of them are unable to utilize glucose. Utilization of oxalate, acetate, succinate, lactate and tartarate is a character common to all of these strains while utilization of formate, citrate, ethanol, dextrin and starch varies with the particular strains. The authors mentioned above reported — also in 1953 — that two further "oxalatic" strains were isolated by them: *Bacterium oxalaticum*, one of which exhibited weak growth in medium with glucose while both of them grew well on formate but did not utilize neither citrate nor succinate.

Pseudomonas OD 1, described by Jayasuriya (1955), does not grow in medium with glucose, methanol, formaldehyde, formate, ethanol, acetaldehyde, acetate, ethylene glycol, glycine, glycerol, malonate, pyruvate, n-butyrate, citrate, glycerate, lactose, starch and dextrin. The same bacterium utilizes, besides oxalate, glycolate, lactate, malate, and succinate. There are no data available on the ability of "oxalatic" actinomycetes to utilize various carbon sources.

There has been still less information on oxalate metabolism. Owing to the lack of the proper methods, it was impossible to find out which of the three Bassalik's hypotheses on the oxalate metabolism was right. The metabolism of this simple compound could as well substantially differ from all three of the patterns proposed. On the grounds of his findings, Bassalik suggested that oxalate could be either reduced to glyoxalate or dissimilated to formate and CO_2 or oxidized to CO_2, which may be then partly reduced.

In studying *Fl. extorquens*, Janota (1956) confirmed that in the mineral oxalate medium there is an uptake of CO_2 during the first period of endogenous respiration. This permitted the author to suggest that the bacteria examined fix CO_2 while oxidizing oxalate.

Since 1958, publications have been appeared in which the *Ps. oxalatica* metabolism was examined by the isotope methods. Quayle and Keech (1958) showed that *Ps. oxalatica* fix carbon both from formate and from CO_2, the process going on chiefly through 1,5-diphosphoribulose. A year later, 1959, Quayle and Keech published the results of their studies on carbon utilization from $NaHC^{14}O_3$ by *Ps. oxalatica* cells cultivated on oxalate. Isotopic carbon was included into malate only, and this occurred solely in small amounts. While investigating how the different cellular fractions of *Ps. oxalatica* cultivated on oxalate included the iso-

topic carbon from oxalate, formate or from bicarbonate, the same authors confirmed in 1960 that CO_2 fixation did not play any cardinal part in the metabolism of oxalates. Besides, Quayle and Keech showed that the oxalate carbon was included into glycine and 3-phosphoglyceric acid during the first three seconds of reaction.

According to the authors mentioned, oxalate (in the form of oxalyl-CoA) seems to undergo reduction to glyoxalate, the precursor of glycine and phosphoglyceric acid. This supposition was confirmed in 1960 by Quayle, Keech and Taylor who showed oxalyl-CoA formation in cell-free extracts and its reduction to glyoxalic acid in presence of *TPN*. The other way of oxalate metabolism consists in decarboxylation as was confirmed by the same authors. Allegedly, as early as 1956, Jakoby *et al.* formulated the hypothesis according to which oxalyl-CoA was formed from acetyl-CoA and oxalate. The former compound could be decarboxylated to formylo-CoA. On the grounds of their findings, Quyale *et al* consider succinyl-CoA a more likely compound active in those reactions than acetyl-CoA.

The brief review of the above works shows that all three of the Bassalik's hypotheses on oxalate metabolism have been definitely confirmed in 1960. However, it ought to be born in mind that Quayle and Keech used an other species of "oxalatic" bacteria in their study than Bassalik did. These species may differ from each other, and they may differ also in their basic way of the oxalate metabolism.

The present paper is aimed at the quantitative investigation of glucose utilization by *Fl. extorquens*, at comparing the ability of this species to utilize various organic acids with that of the strain isolated by Bassalik, and the examining of the $NaHCO_3$ effect on the growth rate of the bacteria studied in the selected acid media.

EXPERIMENTAL

METHODS

Composition of media. A basic medium *A* was used in all experiments; the medium was supplemented with various sources of carbon and nitrogen. The composition of the medium *A* was as follows: K_2HPO_4 — 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.1 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.02 g, NaCl — 0.1 g per 1 litre of distillated water or per 1 litre of phosphate buffer, $pH = 7.0 \pm 0.1$.

During that part of the study in which the ability of *Fl. extorquens* to utilize glucose was examined, the medium was supplemented with 0.1 to 0.5 per cent glucose. Ammonium sulphate or peptone were used as nitrogen source. These substances were added in such quantities that the C : N ratio was always 10 : 1.

The medium was supplemented with ammonium salts of various organic acids in that part of experiments which was aimed at examining the ability of *Fl. extorquens* to utilize those acids as carbon source. The concentrations utilized in the individual experiments were as follows: a) 0.1, 0.3, 0.5; b) 0.1 and 0.5; c) 0.1, 0.3 and 0.5 per cent.

In experiments on the effect of sodium bicarbonate on growth of *Fl. extorquens* in glucose or acid medium, $NaHCO_3$ concentrations ranged from 0.05 to 0.5 per cent depending on the experiment. On one occasion, a natural peat extract, diluted with water by 50 per cent, was applied as a factor stimulating bacteria growth in glucose medium.

Methods of inoculation. The inoculation methods were identical in all of the experiments. The bacteria examined were at first incubated on glucose peptone agar. Because of insufficient growth in this medium, beef-extract-glucose agar was later used. Bacteria from 48-hour culture on agar slants were transferred into the liquid medium, and incubated for 24 hours (or for 48 hours in the case of insufficient growth) at 27°C. The number of bacteria was then checked in a Thoma chamber. The number varied between 45 and $130 \cdot 10^6$ per 1 ml. 0.2 ml of such suspension was introduced into the each culture flasks containing 20 ml of medium each, and two standard loops of suspension were added per 6 ml. of medium contained in each test-tube. In experiments in which the glucose utilization was examined, the bacteria for inoculum were grown in *A* medium with 0.3 per cent glucose and ammonium sulphate (or peptone).

In the last series of experiments on the glucose utilization, the inoculum was prepared on *A* medium with 0.1 per cent ammonium oxalate added. In experiments in which the growth on various acids was examined, the inoculum was prepared on *A* medium supplemented with ammonium salt of the acid investigated in concentration equal to that of the medium in the control cultures.

Culture and observations. In that part of the study in which the utilization of glucose was investigated, the culture were grown in 100 ml Erlenmeyer flasks containing 20 ml medium each. Five flasks were prepared for each combination: two control flasks and three inoculated ones. The culture was grown at 27°C; after one, two or four weeks, final observations of growth were carried out and the utilization of glucose measured.

In the part of the study in which the growth rate of *Fl. extorquens* on various organic acids was examined, the cultures were grown in test-tubes containing 6 ml medium each. The cultures were incubated at 27°C during a period of one month. At first, the observations were carried out every day, and the period when growth was observed and its intensity were recorded; subsequently, the observations were carried out less frequently. The changes in *pH* were defined after one month.

Determinations of the quantity of the glucose utilized. Glucose was determined after the Bertrand micro-methods. The deviation in all of the determinations was within the limits admitted for this method: 2 - 3.5 per cent of the initial amount of glucose.

RESULTS

UTILIZATION OF GLUCOSE

Culture in medium containing 0.3 per cent glucose was used for inoculum in the first experiments. Even after 48-hour incubation growth was very scanty, still it could be seen macroscopically, non the less no glucose utilization was observed. Bacteria grown in a medium containing 0.1 per cent ammonium oxalate was used as an inoculum in the next experiment. $NaHCO_3$ was given in concentrations of 0.05 and 0.1 per cent. Glucose amount was measured twice (see Tables I and II) in the 2-week cultures, and one time in the 4-week cultures.

Table I

Utilization of glucose by *Fl. extorquens* in 2-week cultures
Zużytkowanie glukozy w 2-tygodniowych hodowlach *Fl. extorquens*

No	Combinations	Mg of glucose per 1 flask			Utilization of glucose	
		theoretical	assayed		mg per 1 flask	per cent of initial concentration
			control	after 2 weeks		
1	0.1 per cent glucose	20.0	20.35	17.74	2.61	12.83
2	0.5 per cent glucose	100.0	99.67	100.21	—	—
3	0.1 per cent glucose+ +0.05 per cent $NaHCO_3$	20.0	19. 8	17.44	2.36	11.92
4	0.5 per cent glucose+ +0.05 per cent $NaHCO_3$	100.0	99.91	100.20	—	—
5	0.1 per cent glucose+ +0.1 per cent $NaHCO_3$	20.0	19.98	16.81	3.17	15.87
6	0.5 per cent glucose+ +0.1 per cent $NaHCO_3$	100.0	97.51	100.22	—	—

Table II

Utilization of glucose, 2-week incubation
Zużytkowanie glukozy, hodowla 2-tygodniowa

No	Combinations	Mg of glucose per 1 flask			Utilization of glucose	
		theoretical	assayed		mg per 1 flask	per cent of initial concentration
			control	after incubation		
1	0.1 per cent glucose	20.0	20.24	17.74	2.50	12.35
2	0.3 per cent glucose	60.0	61.20	61.82	—	—
3	0.1 per cent glucose + +0.1 per cent $NaHCO_3$	20.0	20.46	17.99	2.47	12.07
4	0.3 per cent glucose+ +0.1 per cent $NaHCO_3$	60.0	61.79	61.93	—	—

For the first time, the results obtained in this experiment on glucose utilization by *Fl. extorquens* are not completely negative. Insignificant utilization of glucose, ranging from 11.16 to 15.87 per cent, was recorded in individual cases. The bacteria when transferred into mineral medium with glucose from mineral medium containing ammonium oxalate, are able to utilize glucose when the latter's concentration is not higher than 0.1 per cent. At higher concentrations glucose is not utilized even to such an insignificant extent. There is no marked effect of $NaHCO_3$ on the glu-

cose utilization. The above results were confirmed in an experiment in which bacteria were transferred from an oxalate medium into medium containing 0.1 per cent of glucose, mineral salts and peptone as nitrogen source. The bacteria consumed 14.58 per cent of glucose during 2-week culture. The effect of supplementing the glucose medium with peat extract was then studied.

Table III

Utilization of glucose, 4-week culture
Zużytkowanie glukozy, hodowla 4-tygodniowa

No	Combinations	Mg of glucose per 1 flask			Utilization of glucose	
		theoretical	assayed: before incubation	assayed: after incubation	mg per 1 flask	per cent of initial concentration
1	0.1 per cent glucose	20.0	20.16	17.91	2.25	11.16
2	0.3 per cent glucose	60.0	60.09	59.19	—	—
3	0.1 per cent glucose + + 0.1 per cent $NaHCO_3$	20.0	20.31	17.25	3.06	15.07
4	0.3 per cent glucose + + 0.1 per cent $NaHCO_3$	60.0	60.23	57.66	2.57	4.27

Peat extract obtained from not degraded peat in 1959 after the methods described by Bassalik *et al.* (1960) was added to double concentrated mineral glucose medium in the proportion of 1 : 1. The inoculum was prepared from the growth in a medium with the extract, containing 0.3 per cent of glucose. The concentration of glucose in the culture medium was 0.1, 0.3 and 0.5 per cent. In all these concentrations good growth was observed macroscopically after 2-week incubation; brown film of growth developed on the bottom and the walls of the vessel. However, no utilization of glucose could be detected, probably due to the presence of reducing substances in the peat extract. In the cultures containing 0.3 and 0.5 per cent of glucose, the dry weight of bacteria was measured from the difference between the dry mass of the whole culture and that of the control, not inoculated medium.

The results shown in Table IV represent the mean of two experiments.

Table IV

Glucose concentration per cent	Dry mass of bacteria mg per 20 ml of medium
0.3	2.7
0.5	2.6

The bacterial mass obtained in the culture containing 0.3 per cent of glucose was almost identical with that containing 0.5 per cent of glucose. It thus may be concluded that increase in the concentration of glucose to 0.5 per cent does not affect the growth of the bacteria examined.

The growth in the mineral medium with glucose, supplemented with peat extract may be accounted for in two ways. Firstly, there may be no utilization of glucose, the growth being supported by the organic substances contained in the extract. Secondly, the peat extract may contain substances at the presence of which *Fl. extorquens* is able to utilize glucose.

UTILIZATION OF ORGANIC ACIDS

The results of observations made in triplicate are shown in Table V.

It was confirmed that examined strain of *Fl. extorquens* was unable to utilize, as the only source of carbon and energy, the monocarboxylic

Table V

Various organic acids as carbon and energy source for *Fl. extorquens*
Kwasy organiczne jako źródło węgla i energii dla *Fl. extorquens*

Carbon source	Growth at acid concentration			Time interval between inoculation and the first appearance of growth (days)	Final *pH* at acid concentration		
	0.1%	0.3%	0.5%		0.1%	0.3%	0.5%
formate	+	+	—	5	7.2	7.3	
acetate	±	—	—				
propionate	—	—	—				
butyrate	±	—	—	16	6.9		
valerate	—	—	—				
glycolate	—	—	—				
lactate	+++	+++	+++	3	7.2	7.2	7.35
pyruvate	—	—	—				
oxalate	+++	+++	+++	1	7.2	7.8	8.8
malonate	+++	+++	+++	2	7.3	8.4	7.9
succinate	+++	+++	+++	1	7.0	7.6	7.6
glutarate	—	—	—				
α-ketoglutarate	+++	/	/	1	7.2		
fumarate	+++	+++	+++	1	7.2	7.5	8.1
maleinate	+++	+++	+++	2	7.0	6.9	6.5
malate	+++	+++	+++	1	7.2	7.8	7.8
tartarate	++	+++	++	1	7.2	7.4	7.2
oxaloacetate	+++	/	/	1	7.1		
citrate	—	—	—				

Legend: +++ very good growth, ++ good growth, + satisfactory, — no growth, / no data available.

acids, except formate with which insignificant growth was noted at the concentrations of 0.1 and 0.3 per cent only, and acetate and butyrate — at concentration 0.1 per cent.

No growth whatsoever was observed on propionate, valerate, glycolate, pyruvate. On the contrary, *Fl. extorquens* was shown to utilize policarboxylic acids in all of the concentrations tested. The growth on these acids was mostly very satisfactory and perceivable after one or two days of incubation. The only exception here was noted on the citrate. The results obtained basically corresponded to those of Bassalik. The only marked divergency was found in glycolic and glutaric acids on which Bassalik's strain used to grow well. The differences observed could be due to the different methods of inoculation, to the different purity of acids; they also might be related to the enzymatic properties being weaker in the strain examined in the present study.

The final *pH* of the *Fl. extorquens* cultures on various acids is shown in the Table V. The changes were insignificant as the cultures were grown in buffered media; however, insignificant alkalization occurred almost in all occasions, indicating liberation of an excess of NH_4^+ ions.

The effect of $NaHCO_3$ on the ability of *Fl. extorquens* to utilize some acids was examined in the next experiment.

Bacteria were inoculated on media with formate, acetate, oxalate, pyruvate and glycolate at 0.1 and 0.5 per cent concentrations, and on the similar media with 0.1 per cent $NaHCO_3$ added. The cultures were incubated at 27°C for one month. The results are given in the Table VI.

Table VI

$NaHCO_3$ effect on utilization of organic acids as carbon source by *Fl. extorquens*
Wpływ $NaHCO_3$ na wykorzystanie kwasów organicznych przez *Fl. extorquens*

Carbon source	Growth				Rate of growth	Final *pH*			
	without $NaHCO_3$		with 0,1 % $NaHCO_3$			without $NaHCO_3$		with 0,1 % $NaHCO_3$	
	acid concentration:					acid concentration			
	0.1 %	0.5 %	0.1 %	0.5 %		0.1 %	0.5 %	0.1 %	0.5 %
formate	+	−	++	++	slow growth 3 days	7,45		7,8	
acetate	±	−	++	−	slow growth 3 days			7,2	
oxalate	+++	+++	+++	+++	quick growth	7,1	8,6	7,4	8,6
pyruvate	−	−	−	−					
glycolate	−	−	−	−					

Incubation — 31 days. Legend: see Table V.

It was confirmed that, in the bacteria examined, $NaHCO_3$ did not affect the growth rate in an oxalate medium (in which growth is good without the carbonate) nor in pyruvate or glycolate media (in which growth is doubtful). However, with bicarbonate present, growth occurred in 0.5 per cent formate, and good growth — in 0.1 per cent acetate.

The next experiment was aimed at defining the optimal concentrations of formate and acetate combined with various amounts of $NaHCO_3$.

Table VII

$NaHCO_3$ effect on formate and acetate utilization by *Fl. extorquens*
Wpływ $NaHCO_3$ na zużycie mrówczanu i octanu

Acid concentration per cent	$NaHCO_3$ concentration per cent	Growth		Time interval between inoculation and the first appearance of growth (days)	
		formate	acetate	formate	acetate
5					
0,0	0,05	+	+++	1	1
0,05	0,1	+	++	1	1
0,05	0,2	+	++	1	1
0,05	0,3	+	++	3	1
0,05	0,5	+	+	3	1
0,1	0,05	+	++	2	1
0,1	0,1	++	++	1	1
0,1	0,2	+	+++	1	1
0,1	0,3	+	+++	1	1
0,1	0,5	−	+++		4
0,2	0,05	++	+	1	3
0,2	0,1	++	++	1	3
0,2	0,2	++	+++	1	2
0,2	0,3	++	+++	1	2
0,2	0,5	+	++	4	3
0,3	0,05	++	−	4	
0,3	0,1	++	−	3	
0,3	0,2	++	++	1	4
0,3	0,3	+++	+++	1	5
0,3	0,5	−	++		2
0,5	0,05	++	−	2	
0,5	0,1	++	−	3	
0,5	0,2	+++	−	1	
0,5	0,3	+++	−	1	
0,5	0,5	−	+		8

Two of the acids, as well as the bicarbonate, were added in the following concentrations: 0.05, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.5 per cent, each concentration of acid being combined with each concentration degree of bicarbonate. The results are shown in Table VII.

Supplementing the formate medium with sodium bicarbonate had a markedly good effect on the growth rate of *Fl. extorquens* and, first of all, makes the growth possible when the acid concentration is 0.5 per cent (see Tables V, and VII). The combination of 0.3 per cent acid with 0.3 per cent carbonate, and 0.5 per cent acid with 0.2 or 0.3 per cent carbonate showed the most favorable as growth yield was concerned. The rate of growth was partly or even completely inhibited at 0.5 per cent concentration of the carbonate irrespective of the acid concentration.

The combinations of 0.1 per cent of acetic acid and 0.2, 0.3 or 0.5 per cent carbonate, and 0.2 per cent acetic acid and 0.2 or 0.3 per cent carbonate proved the most favourable to growth, while 0.1 per cent acetic acid and 0.2 or 0.3 per cent carbonate were the best concentrations as the rate and amount of growth was concerned.

In contrast to analogous observations on formate, the maximum doses of carbonate inhibited the growth not on all occasions. At 0.5 per cent concentration of acetate, growth was observed on these occasions only when the carbonate concentration was 0.5 per cent too.

DISCUSSION

Close examinations of the ability of *Fl. extorquens* to utilize glucose showed that these bacteria utilized glucose in small amounts (to 16 per cent of the glucose added) and this solely under particular experimental conditions. The concentration of monosaccharide in the medium is to be low, about 0.1 per cent, the bacteria have to originate from an oxalate medium. Under favourable conditions, the bacteria studied seem very likely to synthesize some metabolites which — when introduced into the glucose medium — make possible partial decomposition of the latter. Further utilization of glucose and growth of the bacteria are inhibited after these metabolites are exhausted. An argument in favour of this hypothesis is the insignificant yet perceivable growth of *Fl. extorquens* in a mineral glucose medium after inoculating it with bacteria from nutrient agar. The decrease of glucose concentration — not significant but still beyond the limits of deviation — could be found in a 48-hour culture if bacteria were transferred from the nutrient agar to the mineral glucose medium. In the case when bacteria were incubated in the same mineral glucose medium however, (transferred from glucose agar

without beef extract), the utilization of glucose after 48 hours was doubtful amounting only to 3.5 per cent. This is the top limit of the deviation in glucose assay used in the present work. We have no data at our disposal which would permit to characterize the factors that enabled the bacteria to utilize glucose. We neither know whether they are identical with the peat substances which were responsible for good growth of *Fl. extorquens* in a mineral glucose medium. They may occur in agar as well, for we failed to find any other explanation for the growth which though insignificant, still was observed repeatedly over an almost ten-year period of successive passages (the addition of peptone to a liquid medium with glucose turned out insufficient to obtain growth).

Further, *Fl. extorquens* has a rather characteristic selective ability to utilize organic acids as the only source of carbon and energy. Generally speaking, it may be confirmed that the bacteria studied utilize dicarboxylic acids (glutaric acid excepted), while they utilize monocarboxylic acids to an insignificant extent and sporadically only.

The growth of *Fl. extorquens* on acetate is very markedly stimulated by $NaHCO_3$. The effect of carbonate points out to an obvious analogy between the metabolism of the bacteria studied and that of *Ps. oxalatica* as described by Quayle and Keech.

LITERATURE

Bassalik, K., 1913: Über die Verarbeitung der Oxalsäure durch *Bacillus extorquens n. sp. Jahrb. wiss. Bot.*, **53** : 255.

Bassalik, K., Janota-Bassalik, L., Brisou, J., 1960: Etude sur *Flavobacterium extorquens* (ex *Pseudomonas extorquens*) *Ann. Inst. Pasteur*, **98** : 165.

Bassalik, K., Janota-Bassalik, L., Olczyk, C., Halweg, H., 1960: Méthodes de recherches microbiologiques sur les substances actives des extraits de tourbes. *Acta Microbiol. Polon.*, **9** : 303.

Bhat, J. V., Barker, H. A., 1948: Studies on a new oxalate decomposing bacterium, *Vibrio oxalaticus. J. Bact.*, **55** : 359.

Iyer, V. N., Khambata, S. R., Bhat, J. V., 1960: The characteristics and questionable taxonomic position of the oxalate-decomposing bacterium, *Vibrio extorquens. Proc. Ind. Acad. Sci.*, **51** : 157.

Jakoby, W. B., Ohmura, E., Hayaishi, O., 1956: Enzymatic decarboxylation of oxalic acid., *J. Biol. Chem.*, **222** : 435.

Janota, L., 1956: Metabolism of *Pseudomonas extorquens* Bassalik, *Acta Soc. Botan. Polon.*, **25** : 73.

Jayasuriya, G. C. N., 1955: The isolation and characteristics of an oxalate decomposing organism. *J. Gen. Micr.*, **12** : 419.

Khambata, S. R., Bhat, J. V., 1953: Studies on a new oxalate—decomposing bacterium, *Pseudomonas oxalaticus, J. Bact.*, **66** : 505.

Khambata, S. R., Bhat, J. V., 1953: *Bacterium oxalaticum*, a new oxalate—decomposing bacterium isolated from the intestine of earthworms, *Proc. Ind. Acad. Sci.*, **38** : 157.

Quayle, J. R., Keech, D. B., 1958: Carbon dioxide and formate utilization by formate grown *Pseudomonas oxalaticus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **29** : 229.
Quayle, J. R., Keech, D. B., 1959: Carboxydismutase activity in formate and oxalate grown *Pseudomonas oxalaticus* (strain *0X1*). *Biochim. Biophys. Acta*, **31** : 587.
Quayle, J. R., Keech, D. B., 1960: Carbon assimilation by *Pseudomonas oxalaticus* (*0X1*). 3. Oxalate utilization during growth on oxalate. *Biochem. J.*, **75** : 515.
Quayle, J. R., Keech, D. B., Taylor, G. A., 1960: Metabolism of oxalate in oxalate-grown *Pseudomonas oxalaticus* (*0X1*). *Biochem. J.*, **76** : 3 P.

Ludmiła Janota-Bassalik i *Danuta Pedyk*

ZDOLNOŚĆ DO WYKORZYSTANIA RÓŻNYCH ŹRÓDEŁ WĘGLA, ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM GLIKOZY, PRZEZ *FLAVOBACTERIUM EXTORQUENS* BASSALIK

Streszczenie

Zdabano zdolność *Fl. extorquens* do zużytkowania glikozy jako jedynego źródła węgla i energii. Stwierdzono, że badane bakterie w drugim pasażu w pożywce syntetycznej z glikozą nie zużywają tego cukru. Słabe wykorzystanie glikozy stwierdzono jedynie w przypadku szczepienia bakterii z pożywki szczawianowej względnie bulionowej. Zbadano wzrost *Fl. extorquens* na różnych kwasach organicznych. Stwierdzono, że najkorzystniejsze dla wzrostu są kwasy dwukarboksylowe. Zaobserwowano, że $NaHCO_3$ działa silnie stymulująco na wzrost badanych bakterii na kwasie mrówkowym i octowym.

Authors' address:
Adres autorek:
Dr L. Janota-Bassalik
Katedra Mikrobiologii
Uniwersytetu Warszawskiego,
Warszawa, Nowy Świat 67,
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 1● : 239—248

Ludmiła Janota-Bassalik and *Krystyna Pyrka*

OPTIMUM CONDITIONS FOR THE UTILIZATION OF OXALATES BY *FLAVOBACTERIUM EXTORQUENS* BASSALIK

From the Department of Plant Physiology,
University of Warsaw, Poland
Received 12th March 1961

Summary

The growth of *Fl. extorquens* started within the limits of *pH* 6-8. The intensity of oxalate utilization was the greatest when neutral reaction was maintained, lower — with the acidic reaction, while it was the poorest with the alkaline one. The highest rate of the oxalate utilization was observed when 15 ml of *pH* 7 phosphate buffer per 10 ml of medium was added. Mechanical shaking of the culture affects favourably the intensity of the oxalate utilization. Enrichment of the oxalate medium with sodium bicarbonate brings some increase in the weight of the bacterial yield.

For *Fl. extorquens*, one of the best sources of carbon is oxalate. Although many papers on "*extorquens*" and related species have been published to date (they were listed in the paper by Janota-Bassalik and Pedyk, 1961), there still remained a gap, namely the definition of the optimum conditions for the utilization of oxalates by *Fl. extorquens*. The present paper is aimed at filling this gap.

METHODS

The basic medium for the culture of the *Fl. extorquens* bacteria was a liquid containing per 1 litre of re-distilled water: $(NH_4)_2(COO)_2 \cdot H_2O$ — 1.14 g, K_2HPO_4 — 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ — 0.1 g, $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ — 0.02 g, NaCl — 0.1 g, solution of micro-elements as modified by Bassalik — 1 ml.

The reagents utilized were pure *pro analysis*, *pH* of the medium was brought to 7 by means of 0.1 n phosphoric acid. The medium was filtered through filtering paper and sterilized in the autoclave during half an hour at a pressure of 1.5 atm.

The bacteria were also cultivated in media in which the re-distilled water was substituted by appropriate buffer solutions. These were prepared after Struszyński (1954). The following buffer solutions were applied: 1) 4 *pH*, phtalic buffer, 2) 5-8 *pH*, phosphate buffer, 3) 9 and 10 *pH*, glycocollic buffer.

In all experiments, *pH* was checked by a lamp *pH*-meter to within .01.

An additional source of carbon, $NaHCO_3$ (at concentration of 0.05, 0.075, and 0.1 per cent) was introduced into the medium with *pH* 7 phosphate buffer in the experiments on the effect of carbonate on the *Fl. extorquens* growth in an oxalate medium.

A beforehand prepared inoculum was transferred into the experimental flasks in each of the experiments. As inoculum the culture in basic medium inoculated with a young 48-hour *Fl. extorquens* growth on agar slant was used. The agar medium consisted of (in per cent): agar — 1.5, peptone — 0.5, glucose — 1.0, K_2HPO_4 — 0.05, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.05.

The one-day culture in the basic medium does not yet contain the characteristic film, being almost uniformly turbid, thus permitting to introduce nearly equal numbers of cells into the particular flasks.

Inoculations were carried out with pipettes, the amount inoculated being always equal: 0.2 ml per 25 ml of medium. The number of bacteria in inoculum was counted in the Thoma chamber, and then calculated per 100 ml of medium.

The culture was grown at room temperature (21-22.5°C) in the experiment on the effect of mechanical shaking on the utilization of oxalate; the cultures in the remaining experiments were grown at about 27°C, in the thermostat.

The utilization of COO^- ion was defined by titration with 0.01 N $KMnO_4$.

Each culture was made in duplicate with two control tests. A mean was then calculated.

THE EFFECT OF *pH* ON THE RATE OF THE UTILIZATION OF THE COO^- ION

The range of *pH* examined: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10.

The routinly used 7 *pH* inoculum without buffer was transferred into the media. The number of bacteria per 100 ml of medium was $112 \cdot 10^6$ cells.

The first measurement of the COO^- ion utilization was carried out after 24 hours. The time of the next measurements and the results are shown in Table I.

The growth of the bacteria examined was observed on the media of *pH* 6, 7 and 8. There was no growth of *Fl. extorquens* in *pH* 5 or 9; the non-utilization of oxalate was naturally related to this. The highest rate of the COO^- ion utilization was observed in the neutral reaction. The utilization rate was considerably slower at *pH* 6 while at *pH* 8 it was yet less significant. It would result from the above observations that slightly acidic medium rather than alkaline would be more favourable for growth initiation of *Fl. extorquens*.

THE RATE OF THE COO^- ION UTILIZATION BY *FL. EXTORQUENS* DEPENDING ON THE BUFFER CONTENT IN THE MEDIUM

The experiments were made in four combinations differing in the amount of the *pH* phosphate buffer; these were as follows: I — 25 ml of medium (without any buffer solution), II — 24 ml of medium + 1 ml of buffer solution, III — 23 ml of medium + 2 ml of buffer solution, IV — 21 ml of medium + 4 ml of buffer solution.

The density of bacteria was $57 \cdot 10^6$ per 100 ml of medium, and the temperature of culture was about 27°C.

The first measurement of the oxalate ion was carried out after 24-hour incubation. The time of the next measurements, and the results are given in the Table II.

The culture was grown for 96 hours. Following this period, the utilization of COO^- ion, 98.8 per cent, was nearly the same in all of the combinations.

The medium was alkalized in all combinations. The initial *pH* was 6.8-7 while it was 8.8 by the end of the incubation period. Alkalization progressed somehow slower in the combinations III and IV owing to the higher content of buffer solution. These differences, however, were very insignificant if compared with the combinations I and II.

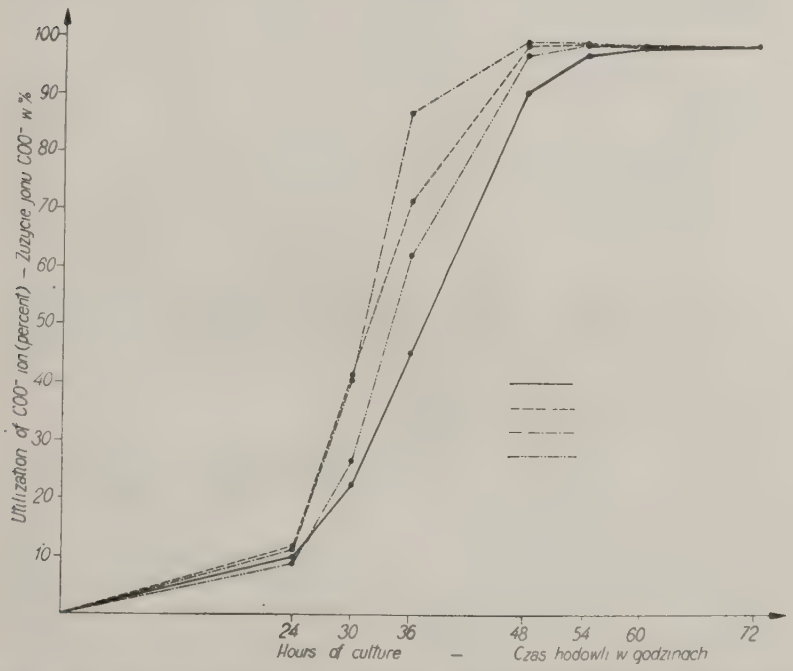


Fig. 1. The rate of utilization of the COO^- ion by *Fl. extorquens* depending on the buffer content in the medium

Wykres I. Wpływ buforu na zużycie jonu COO^-

—— komb. I — var. I - - - - - komb. II — var. II

—.— komb. III — var. III —.·.— komb. IV — var. IV

The rate of utilization of the COO^- ion was slightly lower in the combination I (without any buffer solution), than in the media with buffer. Consequently, the concentration of the buffer solution in the medium may be supposed too low for maintenance of the *pH* within an neutral range, i. e. too low for obtaining a decisive effect on the rate of the COO^- ion utilization.

Table I

The effect of the *pH* on the utilization of the COO^- ion (mg per 10 ml of medium)
Wpływ *pH* na zużycie jonów COO^- (mg na 10 ml pożywki)

Time (hrs)	*pH* 6			*pH* 7			*pH* 8		
	COO^- contents (mg)	COO^- utilized per cent	*pH*	COO^- contents (mg)	COO^- utilized per cent	*pH*	COO^- contents (mg)	COO^- utilized per cent	*pH*
				control					
0	7,62		5,90	7,55		6,90	7,49		7,60
				culture					
24	7,04	7,61	5,90	6,46	14,43	6,90	7,10	5,21	7,60
27	6,97	8,53	5,95	6,08	19,47	6,90	6,66	11,08	7,60
30	6,33	16,93	6,00	5,89	21,99	7,00	6,53	12,81	7,70
33	4,61	39,50	6,10	3,71	50,86	7,15	5,50	26,57	7,85
36	3,26	57,22	6,15	1,86	75,36	7,20	3,71	50,47	7,90
54	0,16	97,90	6,30	0,16	97,88	7,30	0.16	97,86	8, 10

In the experiment 2, the amount of the buffer solution was increased as shown below: I — 25 ml of medium (without any buffer solution), II — 15 ml of medium + 10 ml of buffer solution, III — 10 ml of medium + 15 ml of buffer solution, IV — non-diluted buffer solution (with the corresponding salts added).

The bacteria density was $124 \cdot 10^6$ per 100 ml of medium. The temperature — 27°C. The first measurement of the COO^- ion utilization was carried out after 24 hours. The time of the next definitions, and the results are shown in Fig. 1.

The culture was grown for 72 hours; after this, the utilization of the COO^- ion, 98.9 per cent, was almost equal in all combinations, while the *pH* was varied. The less important changes in the *pH* were recorded in combination IV. After 72 hours it changed from 7.0 to 7.4, while in combination I, with no buffer solution, the changes in *pH* were very considerable, ranging from 6.85 to 9.10.

Also in combination II, these changes were relatively significant: 7.0-8.5; they were less important in combination III, but sill distinct: 6.95-7.85.

Thus, in order to maintain a possibly constant neutral reaction of the media, the latter ought to be prepared on a full buffer solution of *pH* 7. On the basis of the results obtained it was concluded that the buffer solution, supporting a constant neutral *pH* markedly affects the rate of the COO^- ion utilization. This may be seen when comparing the curve of the rate of the COO^- ion utilization with no buffer solution to that for the combinations with buffer solution added.

The rate of the utilization of the COO^- ion was higher in combinations II and III, yet in subsequent experiments the not-diluted buffer was used owing to its much greater buffering capacity.

THE EFFECT OF MECHANICAL SHAKING ON THE UTILIZATION OF COO^- ION BY *FL. EXTORQUENS*

Experiments aimed at examining the effect of mechanical shaking on the utilization of the COO^- ion were carried out in two combinations: I — no buffer solution (salt composition of the basal medium), IV — on full buffer solution (salt composition of the basal medium).

Table II

Experiment A. The rate of the utilization of the COO^- ion depending on the presence of buffer in the medium (mg per 10 ml of medium)
Wpływ buforu na zużycie jonu COO^-

Time (hrs)	Combination I no buffer solution				Combination II 1 ml of buffer + 24 ml of medium			
	COO^- contents (mg)	COO^- utilized (per cent)	COO^- utilized (mg)	*pH*	COO^- contents (mg)	COO^- utilized (per cent)	COO^- utilized (mg)	*pH*
				control				
	7.56			6.85	7.64			7.0
				culture				
24	7.40	1.32	0.10	6.85	7.62	0.26	0.02	7.0
48	5.52	26.98	2.04	8.4	5.10	33.24	2.54	8.4
72	0.54	92.85	7.02	8.6	0.12	98.43	7.52	8.6
96	0.09	98.81	7.47	8.8	0.09	98.82	7.55	8.8
Time (hrs)	Combination III 2 ml of buffer + 23 ml of medium				Combination IV 4 ml of buffer + 21 ml of medium			
				control				
	7.68			6.8	7.68			6.8
				culture				
24	7.52	2.08	0.16	6.8	7.52	2.08	0.16	6.8
48	4.98	35.15	2.70	8.2	5.02	34.76	2.66	7.8
72	0.15	98.04	7.53	8.6	0.15	98.04	7.53	8.5
96	0.09	98.82	7.59	8.8	0.09	98.82	7.59	8.8

The experiment was carried out in 100 ml flat-bottom flasks, each containing 25 ml of medium. The experiments included two groups of flasks each: one group was not subjected to shaking while the other was shaked on a mechanical vibrator for 14 hours a day without interruption. The group of the non-shaked flasks remained close to the vibrator, so that incubation temperature was the same in both groups. The measurement of the utilization of the COO^- ion was carried out in the two groups simultaneously (for the first time after 24 hours).

Combination I. The bacterial number $112 \cdot 10^6$ per 100 ml of medium Incubation temperature — 21.5-22.3°C. The results of experiment are illustrated by Fig. 2.

The growth was good in both series: in the form of a distinct pellicle in the non-shaked flaks, and in the form of thick scraps in the shaked ones.

Combination IV. $102 \cdot 10^6$ bacteria per 100 ml of medium. Incubation temperature — 21.2-22.1°C. The growth was good; the results are given in Fig. 2.

The results obtained showed the rate of the utilization of oxalate in both, the non-buffered and the buffered medium, to be higher in the culture subjected to shaking. Various factors may account for the favourable effect of shaking: among others — better penetration of oxygen and better access of nutrient substances to the cells as a result of the stirring of the medium. The characteristic pellicles formed by *Fl. extorquens* use to be torn whilst shaking is going on and their formation is hampered, which results in an increase of the number of individual cells in the culture. However, qualitative examinations of oxygen demand of *Fl. extorquens* showed that it was relatively small; consequently, the better access of the nutritive components to bacteria can, rather, account for the favourable effect of the shaking.

THE $NaHCO_3$ EFFECT ON THE GROWTH OF *FL. EXTORQUENS* IN OXALATE MEDIUM

A few experiments were carried out in order to investigate the $NaHCO_3$ effect on the utilization of the COO^- ion and on the weight of the bacterial yield. The media were prepared on a 7 *pH* buffer solution, filtered and autoclaved at 1.5 atm during 30 minutes. In each experiment, after the growth was completed, the weight of the bacterial cells was measured. For this purpose, the contents of three flasks, i. e. 75 ml, from each combination, were centrifuged at 11,000 r.p.m. for 5 minutes. The sediment was dried up till constant weight was obtained The weight of bacterial cells was calculated per 100 ml of medium.

The following experiments were carried out: A — $96 \cdot 10^6$, B — $112 \cdot 10^6$,

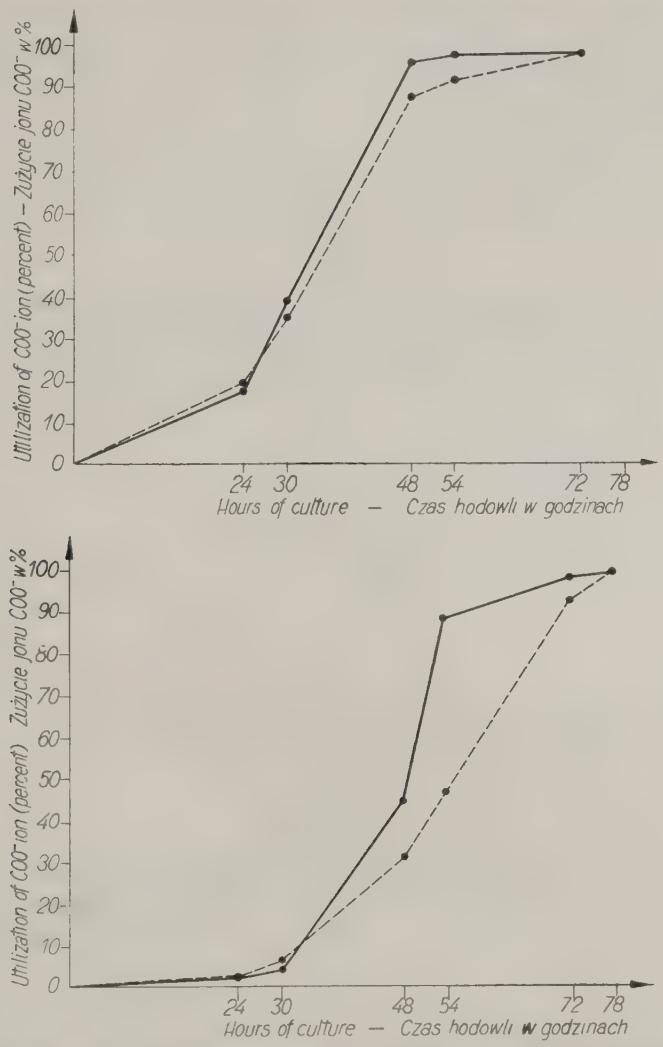


Fig. 2. The effect of mechanical shaking on the utilization of the COO— ion by *Fl. extorquens*

Wykres 2. Skutek wstrząsania mechanicznego na zużycie jonu COO— przez *Fl. extorquens*

———— culture subjected to shaking; - - - - - - - - no shaking
Upper figure: var. I no buffer — komb. I bez buforu
Lower figure: var. IV on the buffer — komb. IV na buforze

C — $92.5 \cdot 10^6$, D — $102.4 \cdot 10^6$ of bacteria inoculated per 100 ml of medium.

The following combinations were carried out: A — no $NaHCO_3$ added, B — 0.05 per cent $NaHCO_3$ added, C — 0.075 per cent $NaHCO_3$ added, D — 0.1 per cent $NaHCO_3$ added.

It was established that enrichment of the oxalate medium with sodium bicarbonate did not markedly affect the rate of oxalate utilization. The yield of bacterial cells (see Table III) indicated the favourable $NaHCO_3$

Table III

Dry weight of the *Fl. extorquens* yield at various $NaHCO_3$ concentrations
Plon suchej masy *Fl. extorquens* przy różnych stężeniach $NaHCO_3$

Experiment \ Combination	Dry weigth mg/100 ml of medium			
	A	B	C	D
A	38.7	41.6	—	—
B	28.7	33.6	34.7	32.0
C	56.3	60.0	71.1	59.7
D	38.5	41.1	53.5	46.0
Mean	40.6	44.1	53.1	45.9

effect on the synthesis of the cellular components. The largest weight of the bacterial yield, 125 per cent if compared to that with no carbonate added, was obtained when 0.075 per cent $NaHCO_3$ was added.

DISCUSSION

Bassalik (1913) maintained that *B. extorquens* was more resistant to the alkaline reaction of the medium than to the acidic one. Jayasurija (1955), studying other "oxalatic" bacteria, *Pseudomonas OD1*, confirmed that the growth of this organism starts at an initial *pH* of the medium ranging within the limits of 6.5—9.0, the optimum *pH* laying within 7.0 and 8.0. During the growth of *Pseudomonas OD1*, the *pH* level of the medium rised from 7.0 to 9.5. The optimum *pH* level, in the respect of oxalate utilization by the bacterium isolated by Satoshi Kaneda (1957), was 7.8. These data do somewhat diverge from the findings of the present study: it was showed that *Fl. extorquens* could start growing at the *pH* level ranging between 6 and 8, while there was no growth at *pH* 5 and 9. The highest rate of oxalate utilization occurred when the reaction was neutral, while it was slower with acidic reaction,

and the lowest at *pH* 8. The neutral reaction is the most favourable to the growth of *Fl. extorquens* disregarding the fact that the complete utilization of oxalate in non-buffered medium caused alkalization and *pH* rising to 9. In a medium containing 0.1 per cent ammonium oxalate, neutral reaction can be maintained by preparing the medium on a non-diluted phosphate buffer. A partially diluted buffer is more favourable than the non-diluted one, as the rate of the oxalate utilization is concerned, in spite of the fact that the former does not maintain the neutral reaction. Perhaps, the general salt concentration in the medium plays a role in this case.

The effect of mechanical shaking of the culture during 14 hours a day showed favourable in respect to the rate of the oxalate utilization in both the buffered and the non-buffered medium. The qualitative observations on the oxygen demand of the bacteria studied are indicative of this demand being rather low. Mechanical shaking of the culture seems favourable due to making the nutritive more easily accessible. Supplementing the medium with sodium bicarbonate had no marked effect on the rate of the oxalate utilization. However, the addition of carbonate did always result in rising of the bacterial yield. The presence of carbonate did not cause a noticeable increase in the number of bacteria, still the increase seems sufficient for suggesting that *Fl. extorquens* utilizes, to a small extent, carbon from the carbonate besides that from the oxalate.

LITERATURE

Bassalik ,K., 1913: Über die Verarbeitung der Oxalsäure durch *Bacillus extorquens n. sp. Jahrb. wiss. Bot.*, **53** : 255.

Janota-Bassalik, L., Pedyk, D., 1961: Ability of *Flavobacterium extorquens* Bassalik to utilize various sources of carbon with particular reference to glucose. *Acta Microbiol. Polon.*, **10** : 225.

Jayasuriya, G. C. N., 1955: The isolation and characteristics of an oxalate decomposing organism. J. Gen. Microbiol., **12** : 419.

Satoshi Kaneda, 1957: *Koso Kagaku Shinpojiunm*, **12** : 187, wg 1958: *Chem. Abstr.*, **52** : 6489.

Struszyński, M., 1954: Analiza ilościowa i techniczna, Warszawa PWN.

Ludmiła Janota-Bassalik i *Krystyna Pyrka*

OPTYMALNE WARUNKI ZUŻYWANIA SZCZAWIANÓW PRZEZ *FLAVOBACTERIUM EXTORQUENS* BASSALIK

Streszczenie

Zbadano wpływ odczynu pożywki, zawartości buforu w pożywce, mechanicznego wstrząsania hodowli, oraz uzupełnienia pożywki szczawianowej kwaśnym węglanem sodu na wzrost i zużywanie szczawianu przez *Fl. extorquens*. Stwierdzono,

że wzrost *Fl. extorquens* rozpoczyna się w granicach *pH* od 6 do 8. Intensywność zużycia szczawianu jest największa przy odczynie obojętnym, mniejsza przy kwaśnym, najmniejsza przy odczynie zasadowym. *Fl. extorquens* najszybciej zużywa szczawian w pożywce zbuforowanej zawierającej na 10 ml pożywki 15 ml buforu fosforanowego o *pH* 7. Na intensywność zużycia szczawianu wpływa korzystnie mechaniczne wstrząsanie hodowli. Uzupełnienie pożywki ze szczawianem kwaśnym węglanem sodu wpływa na nieznaczne, ale powtarzalne zwiększenie ilości masy bakteryjnej.

Authors' address:
Adres autorek:
Dr L. Janota-Bassalik,
Katedra Mikrobiologii
Uniwersytetu Warszawskiego,
Warszawa, Nowy Świat 67,
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, **10** : 249—254

Roman Pakuła

INTERSPECIFIC TRANSFORMATION AS A MEANS OF DETERMINING GENETIC RELATIONSHIPS IN STREPTOCOCCI *

From the State Institute of Hygiene, Warsaw
Received 3d march, 1961

Summary

Transformation reactions were carried out with the use of the following recipients: a viridans streptococcus, a group *H* hemolytic streptococcus, a strain of *Str. sanguis* and the *R36A* strain of pneumococcus.

As donors were used streptomycin resistant mutants of the above mentioned strains as also of group *A* and *C* hemolytic streptococci, of *Str. salivarius*, of enterococci and of a strain of staphylococcus.

No differences in efficiency of transformation were found in reciprocal transformation reactions between *Str. sanguis* and the group *H* streptococcus. Both these strains were transformed with *DNA* from pneumococci with much higher efficiency than with *DNA* from other streptococci.

In the early days of bacteriology physiological as well as morphological differences readily determinable in the laboratory were already widely used in classification. Obviously there are no difficulties in the primary subdivision of bacteria into large morphological groups as cocci and rod-shaped bacteriae or large nutritional groups such as autotrophs and heterotrophs. However, beyond such primary subdivision, classification becomes increasingly difficult. It is quite clear that the reason for this is that not nearly enough is known of the phylogenetic relationships of different bacteria, necessary in their classification into genera and species.

In adddition to the mentioned morphological and physiological criteria, bacteriological taxonomists have made use of two other criteria, pathogenicity and antigenic structure.

Bacteria are clonally reproducing organisms, and different ways of

* Read at the Symposium on Laboratory and Epidemiological Studies of Streptococcal Infections in Central Europe, WHO, Prague, 6-10 December 1960.

defining bacterial species were therefore used for their classification and for the classification of higher, sexually-reproducing organisms. Genetic relationship is one of the major criteria in the speciation of sexually-reproducing organisms, and the ability to exchange genetic material is, a *sine qua non* condition for the definition of two organisms as belonging to the same species. However, no use could be made of this major criterion in the speciation of bacteria until recently. The rapid development of bacterial genetics in the post-war period brought to light more and more evidence in favour of the existence of an exchange of genetic material among bacteria. Today we know three different mechanisms of recombination of genetic material in bacteria: transformation, transduction and conjugation. This makes it possible to define at least some bacterial species in terms of the capacity to exchange genetic material and to compare how well species, and possibly also genera, defined on the basis of morphological, physiological and other characteristics accord with whatever the bacterial geneticist would acknowledge as species by utilizing the criterion of potential genetic exchange.

It is impossible in this short report to discuss the contribution to bacterial taxonomy of the mechanisms of recombination of bacteria according to present knowledge. Here I shall limit myself to a discussion of the problem of transformation, and principally to the genus *Streptococcus*.

Before passing to this subject I should like to mention the work of Schaeffer (1958) on homo- and heterospecific transformations within the genus *Hemophilus*. Schaeffer has found by use of ^{32}P-labelled *DNA* that *DNA* from one species of the genus *Hemophilus* can be taken up by another species of the same genus as easily as *DNA* of the other species. The same number of *DNA* molecules is taken up by the homologous and heterologous species as was found by measuring ^{32}P uptake. However, quantitative measurements of the frequency of transformation have shown that the frequency of interspecific transformation is always much lower than the interspecific transformation. It was in fact found that, while the frequency of intraspecific transformation to streptomycin resistance of *Hemophilus influenzae* is of the order 1×10^{-3}, the frequencies of interspecific transformations with *DNAs* from *H. parainfluenzae* and *H. suis* are respectively 3×10^{-6} and 1×10^{-7}.

Since the *DNAs* of *H. parainfluenzae* and *H. suis* have no difficulty in entering the cells of *H. influenzae*, then the fact that the frequencies of such interspecific transformations are lower than that of the intraspecific transformation must be due to some processes other than penetration.

According to Schaeffer, low efficiency in interspecific transformations is due to incompatibility of pairing between the *DNA* of the donor bac-

teria and the *DNA* of the recipient bacteria. This would mean that pairing is an essential prerequisite of integration of an exogenous marker into the bacterial genome. It may be assumed that exactness of pairing depends on structural homology of the exogenous marker and endogenous *DNA* molecules.

In 1957 Bracco and associates reported transformation of two viridans strains of streptococci using *DNA* of these strains and also *DNA* from *Str. salivarius* and from pneumococci.

At the time when the paper of Bracco and associates was published we too were in possession of several transformable viridans strains, and found that the strain *Challis* of a group *H* streptococcus and a related strain of *Str. sbe* type *I/II* can both be transformed to streptomycin resistance with the rather high efficiency of about 5 per cent.

Further experiments revealed the possibility of the transformation of some streptococcal species not only with *DNA* of the homologous species but also that of heterologous streptococcal species, of pneumococci and even staphylococci.

We took advantage of this opportunity and carried out quantitative transformation reactions with *DNA* from different sources. The transformable recipient strains used in these experiments were divided into three groups:

1. *Str. sbe*, type *I II* and strain *Challis* of the group *H* streptococcus;
2. green streptococci other than *Str. sbe*;
3. a pneumococcus represented by the strain *R36A*.

The results obtained are shown in three tables.

Table I

Efficiency of transformation reactions of *Str. sanguis* type *I/II* and strain *Challis* group *H* hemolytic streptococcus with homologous and heterologous *DNA*
Wydajność transformacji *Str. sanguis I/II* i szczepu *Challis* grupy *H* hemolitycznych paciorkowców przy pomocy homo- i heterologicznego *DNA*

Donor strains	Recipient strains	
	Str. group *H*, Strain *Challis*	*Str. sanguis*, Type *I/II*
Str. group *H*, strain *Challis*	5×10^{-3}	5×10^{-3}
Str. sanguis, type *I/II*	5×10^{-3}	5×10^{-3}
Diplococcus pneumoniae strain *R36A*	3×10^{-3}	2.5×10^{-3}
Str. viridans, strain *158*	1×10^{-3}	5×10^{-4}
Str. salivarius, strain *167*	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-5}$	1×10^{-4}
Str. group *A*, strain *G III*	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-5}$	3×10^{-4}
Str. group *C*, strain *C4*	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-5}$	1×10^{-5}
Staphylococcus aureus, strain *70*	5×10^{-6}	5×10^{-7}
Enterococcus, strain *D3*	2×10^{-6}	—

It may be seen from Table I that in reciprocal transformation reactions the strains *Challis* and *Str. sbe* * behave as one would expect from two strains belonging to the same species. The efficiency of transformation reactions of each of these strains is just the same with *DNA* of the homologous and of the heterologous strain.

Much evidence of their physiological and immunological nature brought to light by the work of Dodd (1949) and Porterfield (1950) indicates a close relationship between the group *H* hemolytic streptococci and *Str. sbe* type *I/II*. This suggests the possibility of combining both of the organisms in question in one species despite minor differences existing between them. With the existing genetical evidence it is my opinion that no reasonable arguments remain for not doing so.

It may be also seen from Table I that both *Str. sbe* and the strain *Challis* are transformed to streptomycin resistance by *DNAs* from *Str. mitis* and *Str. salivarius* by *DNAs* from the hemolytic streptococci of group *A* and *C*, by enterococcal, pneumococcal and even staphylococcal *DNA*.

The frequencies of transformation reactions given in Table I indicate that *DNA* of the pneumococcal strain *R36A* fits better to both recipients than *DNA* from *Str. mitis*, *Str. salivarius*, hemolytic streptococci of group *A* and *C* and enterococci. It has also to be stressed that the strains *Str. sbe* and *Challis* are transformed by enterococcal *DNA* with a very low frequency, as low as with *DNA* of staphylococci belonging, according to Bergey, to a different family from streptococci.

If one assumes that the frequency or transformation reactions reflects the relationship between the recipient and donor strains, then it must

Table II

Efficiency of transformation reactions of a *viridans* strain *158* with homologous and heterologous *DNA*

Wydajność transformacji paciorkowca *viridans*, szczep *158*, przy pomocy homo- i heterologicznego *DNA*

Donor strains	Recipient strain a *viridans* strain *158*
a *viridans* strain *158*	2×10^{-3}
Diplicoccus pneumoniae strain *R36A*	1×10^{-4}
Str. group *H* strain *Challis*	5×10^{-5}
Str. sanguis, type *I/II*	5×10^{-5}
Str. group *C*, strain *C4*	1×10^{-6}
Str. salivarius, strain *167*	9×10^{-7}

* The name *Str. sanguis* is also used for *Str. sbe.*

be admitted that the strains of *Str. sbe* and *Challis* are more closely related to pneumococci than to *Str. salivarius* and to the hemolytic streptococci of groups *A* and *C*, not to mention the enterococci whose *DNA* transforms the strains of *Str. sbe* and *Challis* with a very low efficiency.

Table II represents homologous and heterologous transformation reactions with a strain *Str. mitis* as recipient. It may be seen that the marker of streptomycin resistance from pneumococci transforms this strain with a higher frequency than the marker from any streptococcal strain tested. It is necessary to stress that the *DNA* of the pneumococcus is in this case about 100 times more effective than the *DNA* of *Str. salivarius*.

Table III

Efficiency of transformation reactions of *Diplococcus pneumoniae* strain *R36A* with homologous and heterologous *DNA*

Wydajność transformacji *D. pneumoniae*, szczep *R36A*, przy pomocy homo- i heterologicznego *DNA*

Donor strains	Recipient strain *Diplococcus pneumoniae*
Diplococcus pneumoniae strain *R36A*	2.4×10^{-3}
Str. sanguis, type *I/II*	2×10^{-4}
Str. group *H*, strain *Challis*	2×10^{-4}
a *viridans* strain *158*	4×10^{-5}
Str. salivarius, strain *167*	1×10^{-6}
Str. group *C*, strain *C4*	1×10^{-7}

In Table III are given transformation reactions with the pneumococcal strain *R36A* as recipient. It may be seen that *DNA* of *Str. salivarius* and of group *C* hemolytic streptococci transforms pneumococci with a low frequency, much lower than with the markers of *Str. sbe* and *Challis* and that of the strain of *Str. mitis*.

What is the significance of this data, and what conclusions may be drawn from it? If we assume that the ability to integrate *DNA* from a donor strain into the genome of a recipient reflects the relationship between these two strains, and that pairing incompatibility arises only when two strains evolve to a considerable extent in different directions, then we may suppose that a comparison of the frequency of transformation reactions may be a criterion of relationship.

This would suggest the necessity for including the pneumococci into genus *Streptococcus*, and for the formation of a new genus *Enterococcus* within the tribe *Streptococcaceae*.

We must however add that there is not enough evidence in support of the theory that pairing incompatibility is always a result of genetic incompatibility, and not of other factors.

LITERATURE

Bracco, R. M., Krauss, M. R., Mac Leod, C. M., 1957: Transformation reactions between Pneumococcus and three strains of streptococci. *J. exp. Med.*, **106** : 247.

Dodd, R. L., 1949: Serological relationship between *Streptococcus* group *H* and *Streptococcus sanguis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **70** : 98.

Pakuła, R., Hulanicka, E., Walczak, W., 1958: Transformation reactions between streptococci, pneumococci and staphylococci. *Bull. Acad. Polon. Sci. ser. sci. biol.*, **8** : 325.

Porterfield, J. S., 1950: Classification of streptococci of subacute bacterial endocarditis. *J. Gen. Microb.*, **4** : 92.

Schaeffer, P., 1958: Interspecific reactions in bacterial transformation. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12** : 60.

Roman Pakuła

ANALIZA POKREWIEŃSTWA GENETYCZNEGO W OBRĘBIE RODZAJU *STREPTOCOCCUS* I *PNEUMOCOCCUS* METODĄ MIĘDZYGATUNKOWEJ TRANSFORMACJI

Streszczenie

Przeprowadzono krzyżowe reakcje transformacji przy użyciu jako biorców paciorkowca zieleniejącego, paciorkowca hemolizującego grupy *H*, *Streptococcus sanguis* i szczepu dwoinek zapalenia płuc, a jako dawców wymienionych wyżej szczepów oraz nadto paciorkowców hemolizujących grup *A* i *C*, *Str. salivarius*, enterokoków i gronkowców. Ilościowe wyniki przekazywania wzajemnego markera streptomycyno-oporności między szczepem *Str. sanguis* i paciorkowcem grupy *H* wskazują na podobieństwo lub identyczność markera w obu bakteriach.

Wzmiankowane szczepy są transformowane przez *DNA* szczepu dwoinek zapalenia płuc ze znacznie wyższą wydajnością niż przez *DNA* jakichkolwiek innych paciorkowców.

DNA z enterokoków transformuje szczep paciorkowca hemolizującego grupy *H* z wydajnością tego samego rzędu co gronkowce, ale znacznie niższą niż *DNA* dwoinek zapalenia płuc.

W pracy dyskutuje się możliwość wykorzystania ilościowych wyników transformacji jako kryterium taksonomicznego.

Sugeruje się włączenie dwoinek zapalenia płuc do rodzaju *Streptococcus* i utworzenie odrębnego rodzaju *Enterococcus* w obrębie trybu *Streptococcaceae*.

Author's address:
Adres autora:
Prof. Dr R. Pakuła,
Państwowy Zakład Higieny
Warszawa, Chocimska 24,
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 255—270

Adam Drozdowicz

INVESTIGATIONS ON CELLULOSE DECOMPOSITION BY MYXOBACTERIA FROM THE GENUS *SPOROCYTOPHAGA* *

From the Department of Agricultural Microbiology,
Central College of Agriculture (SGGW), Warsaw
Received 1th March 1961

Summary

The method of purification of *Sporocytophaga myxococcoides* has been presented. The intensity of cellulose decomposition as influenced by size of inoculum, contaminating bacteria and their metabolites, vitamins, amino acids, different sources of nitrogen, and of carbon, of aeration were investigated. The active enzyme preparation was obtained and with its use, a partial hydrolysis of cellulose was received. The formation of glucose as an intermediate product of cellulose decomposition by living bacteria has been proved chromatographically.

The aerobic cellulose-decomposing bacteria reckoned now among *Myxobacterales* (Bergey, 1957), were for the first time described by Hutchinson and Clayton (1919). Since that time a lot of research has been made with this organism. The great attention paid to the cellulolytic myxobacteria was caused both by their interesting life cycle and some taxonomic indistinctnesses connected with it, as well as some of their biochemical characters. There were especially many arguments dealing with the problem of *Cytophaga* and *Sporocytophaga* relation to carbon sources other than cellulose. Up to recent times the mechanism of aerobic decomposition of cellulose was not fully understood. The complete understanding of the life cycle, and the taxonomy of the organism are owed to Krzemieniewska (1930, 1933). The erroneous view of Hutchinson and Clayton who described *Cytophaga* as obligatory cellulolytic organism was overthrown by Stanier (1942 a) and Fåhreus (1941, 1947)

* This work has been partly supported by the grant of Microbiological Committee of the Polish Academy of Sciences.

who have made detailed quantitative investigations. The latter has proved that glucose in certain concentrations not only does not retard the decomposition of cellulose, but on the contary it is for *Cytophaga* one of the best sources of carbon.

In the discussion on the aerobic path-way of cellulose decomposition, the theory of oxydative decomposition should be considered a historic one. In order to show that microbial aerobic decomposition of cellulose is hydrolytic in character, the presence of glucose as decomposition product had to be proved. This was difficult, because glucose very quickly undergoes farther transformations. These difficulties were not only met by workers dealing with myxobacteria, but with other cellulolytic aerobes as well, Pringsheim, (1909, 1912, 1920), Kalninš (1930). The various data obtained may be considered as the result of these difficulties. Imszeniecki (1938) working with wyxobacteria was first to show the presence of traces of the reducing substances. Later, Fåhreus (1946) working with the enzymatic preparations obtained from *Cytophaga* has proved the occurrence of reducing substances which could be determined quantitatively. The development of glucose in the living culture of *Sp. myxococcoides* was also proved in the present work.

MATERIAL AND METHODS

The investigated strain was isolated from a mature manure in 1953 by inoculating with it the liquid selective medium of Dubos (1928) containing filter paper as a sole source of carbon. The filter paper was introduced to the medium by immersing its strips up to 2/3 in the liquid. After the first sign of growth on the filter paper the gradual elimination of contaminating microorganisms was undertaken by means of successive passages on the selective medium. After several passages a group of microbes, very difficult for further separation, was obtained. This group was composed of *Sporocytophaga* and a small rod. In order to obtain a pure culture, several common and some especially elaborated methods were applied. The obtaining of a culture which could be considered a pure one was not a simple task. The connection between *Sporocytophaga* and the associating bacteria is much stronger than it is generally believed. The cultures considered later as pure were obtained only by heating or by isolating ascending cells of *Sporocytophaga* on the filter paper strips. The effectiveness of both these methods was checked in 20 replications. In 8 cases the pure cultures were obtained by heating (10-day cultures in the liquid medium — after removal of the not decomposed filter paper — were heated for 10 minutes at 65-67°C and transferred to the fresh medium). Only in 2 cases pure cultures were obtained by the second method. The purity of culture was controlled microscopically in stained smears (the presence of normally staining organisms indicated the contamination), or by inoculating the plates with nutrient agar or agar synthetic medium with glucose or cellobiose.

The biological activity of the strain was determined by measuring of the decrease of weight of the filter paper in the liquid medium. The weight of filter

paper was determined by modified antiformin method (Gutgisser, 1936). The modification is based on the use of hot antiformin, and the replacement of asbestos filters with the porous glass ones. It was observed that this method is as accurate as the methods used by Kalninš (1930) and Śnieszko (1934), or the one described by Fåhreus, being much less time consuming. The quantitative experiments were made in 6 replications. Bacteria were grown at the temperature of 30-31°C. In the experiments on the effect of different carbon sources, sugar solutions were sterilized separately and introduced aseptically to the medium. Similar procedure was observed with the use of vitamins. Agar used in the experiments was purified very carefully.

Basing on the results of preliminary tests, the uniform and rich in microorganisms inoculum was used in all experiments. Flasks containing 25 ml of the liquid medium and about 0.2 g of the filter paper were inoculated by introducing 2 ml of bacterial suspension containing $6 \cdot 10^6$—10^7 cells per 1 ml, directly on the filter paper. This density of cells was reached after 10-day incubation at 30°C. This method of inoculation provided a proportionate development of microorganisms and gave the statistically proved data.

The reducing substances were determined by means of descending paper chromatography using Whatman no 1 filter paper and butanol : acetic acid : water (4 : 1.5 : 5) as solvent. Chromatograms were developed with ammonia solution of silver nitrate. The medium was previously freed of bacterial cells and cellulose, by filtration; proteins were then removed and the medium concentrated to half of its initial volume. The control of the decrease of glucose amount added to the medium was made by means of Benedict's reagent. The method of obtaining of enzymic preparation is described on other place.

The examined organism was classified to the genus *Sporocytophaga*. It resembles most *Sp. myxococcoides* (Krzemieniewska, 1930, Stanier, 1940, Fåhreus, 1940, 1942 b). The investigated strain differs from the strains described by other authors in the following characters: the vegetative cells and microcysts stain very weakly with generally used stains; the pigment formed on the filter paper does not change from light yellow to brown during aging (Bergey, 1957) — yellow coloured spots of the filter paper become lighter as the time goes by, until complete decolorization at the time preceding the decomposition; the colonies on nutrient agar with glucose do not form cavities (Bergey, 1957, Żukowa, 1959), grow distinctly on the surface, are almost colourless, slightly glittering, punctiform with smooth surface and entire margin; the cultures on nutrient agar with glucose or cellobiose degenerate quickly and do not grow after transferring to the fresh medium (both, filter paper or nutrient agar with sugars); do not grow on the media containing peptone, yeast extract, or urea as a sole source of nitrogen (Bergey, 1957, Krasilnikow, 1949). The presence of these compounds, however, in the medium containing nitrates or ammonium salts does not inhibit the growth of this organism; the characteristic smell of the culture was not confirmed (Fåhreus); do not acidify the medium (Fåhreus).

EXPERIMENTAL

The cellulolytic activity of the strain on standard medium is presented in Fig. 1: the bacterial growth becomes evident after 4 days, then rapid growth follows and after 16-18 days the decomposition of the filter paper reaches its maximum, amounting about 36.5 per cent (curve A). This does not, however, indicate the real activity of the strain, as in the conditions of our experiment, the decomposition of the filter paper takes place only on a very limited surface of the strip (uniform decomposition of the filter paper fragments immediately above the surface of the liquid — 3-5 mm zone — and isolated dispersed centers of decomposition above this zone; the part of filter paper immersed in the liquid does not undergo decomposition). The strain decomposes the filter paper very actively indeed. A disc of filter paper placed on silica gel and inoculated with bacteria is completely decomposed after 15-20 days. The growth on the silica plates, however, could not be used for the quantitative determination of the filter paper decomposition because it was difficult to separate the remainder of the filter paper and the slime from the bed. Data obtained in other growth techniques were disqualified statistically and could not be used for comparison.

The influence of various factors on the intensity of decomposition was then investigated.

THE SIZE OF INOCULUM

The inoculation with 1 ml of the standard suspension ($^1/_2$ of a dose) delayed for about 48-72 hours the visible growth. The intensity of decomposition in individual samples was not uniform until 16-18 days, thus the results were statistically disqualified. After 16-18 days of incubation the results, similar to these with the standard dose (2 ml) were obtained. Inoculation with a double dose (4 ml) did not influence the dynamics of decomposition and the decomposition curve was almost identical with the standard one.

The microscopic observations have shown that during the stationary growth the liquid medium is almost free of bacteria. The bacteria gain access to the filter paper above the surface of the liquid accumulating themselves along the fibres. Their contact with the fibres is not very strong, however, and shaking by hand may remove most of the cells from the filter paper to the liquid. Data indicating the proportions between microcysts and the rod forms during the different stages of growth in standard conditions are presented in Fig. 1 (curve C). Percentage of microcysts in proportion to the total number of bacteria resuspended from the filter paper into the liquid was measured (in each case the bacteria in about 100 microscopic fields were counted). The investigation

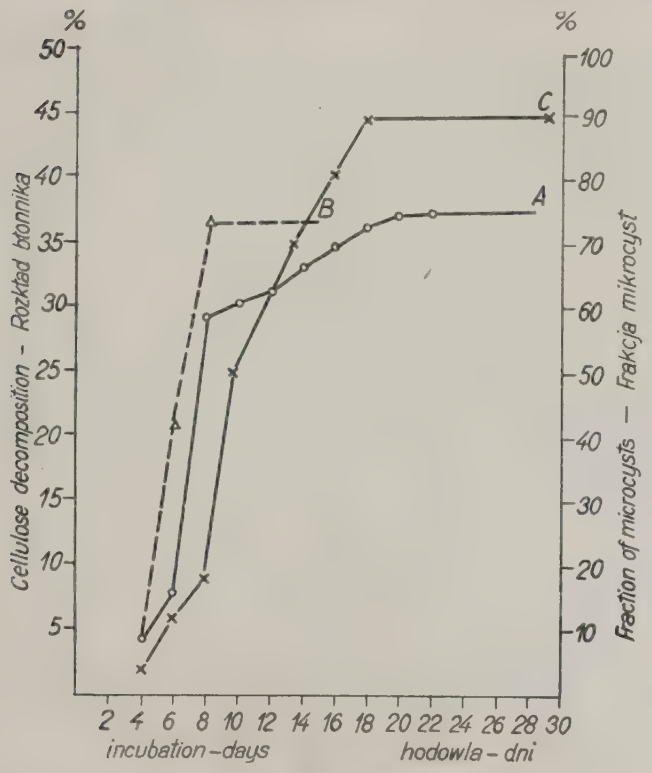


Fig. 1. Curve A — cellulose decomposition — standart conditions, curve B — cellulose decomposition by mixed culture of *Sporocytophaga* and contaminant, curve C — microcysts formation — standard conditions

Rys. 1. Krzywa A — rozkład błonnika w warunkach standardowych, krzywa B — rozkład błonnika w hodowli mieszanej (*Sporocytophaga* + bakteria towarzysząca), krzywa C — tworzenie mikrocyst w warunkach standardowych

of the dynamics of the bacteria growth conducted by this method permits a rough conclusion only: the highest number of microorganisms (translocated by shaking from the filter paper into liquid) was found between 10-12 days of incubation. There are about $6\text{-}10 \cdot 10^6$ cells per 1 ml then. Later the number of bacteria drops down, presumably because of lysis of the long cells. The autolysed cells form with the remainders of the filter paper somewhat more resistant complex and cannot be removed from fibers. During the intensive lysis the microcysts are absorbed strongly on the filter paper due to the slime produced.

THE INFLUENCE OF CONTAMINATING BACTERIA

If the medium was inoculated with the mixed culture (*Sporocytophaga* and associating bacteria) the maximal decomposition, which was not higher than with the pure culture, was reached after 8 days already (Fig. 1, curve B). The same result was obtained when instead of living cells of contaminant the filtrate of its liquide culture was added. (Bacteria grown on the liquid medium containing glucose and KNO_3 were filtered through the Chamberland filter L_3 after all glucose was used. The filtrate after the adjustment of *pH* to 7.0 was aseptically introduced into the standard medium before the inoculation with *Cytophaga* took place). The introduction of 2-5 ml of filtrate caused the decomposition which was almost identical with the course illustrated by curve B (Fig. 1). Lower doses did not influence the course of decomposition. The higher doses had an inhibitory effect expressed by slower and less intensive decomposition: the growth appeared after 6 days, after 10 days filter paper was decomposed in 15 per cent, after 14 days — 19 per cent, and after 18 days — 20 per cent, being also the maximum of decomposition. The negative effect was also observed when the concentrated filtrate was used, e. g., the introduction of 5 ml of double concentrated filtrate gave the inhibitory effect as described above. The inhibitory effect of higher doses of the filtrate may by partly explained by the introduction of larger amount of metabolites originating from the associating bacteria.

In the mixed cultures (*Sporocytophaga* + associating bacteria) and in the media containing filtrate as well, the number of microcysts is very small. Both within stimulating and inhibiting doses of filtrate the fraction of microcysts did not exceed 10 per cent, even at the end of experiment (30 days). It was observed in the samples left as control for a longer time, that the activity of the factor responsible for the inhibition of the transformation into the microcysts diminished after about 90 days. After this period the absolute majority of bacteria (about 90 per cent) existed in the form of microcysts.

THE INFLUENCE OF VITAMINS AND AMINO ACIDS

The standard medium was enriched alternatively with thiamine, riboflavin, niacin, and calcium pantothenate (0.005-100 μg/ml), biotin and cobalamin (0.001-10 μg/ml), alanine, aspartic acid, glutamic acid, and tryptophane (1-100 μg/ml). The influence of 10 per cent yeast extract added in proportion of 0.1-2.5 ml/25 ml of the medium was also investigated. Only thiamine in the doses $>$ 1 μg/ml (higher doses did not change the stimulating effect) and cobalamin in the doses of 0.05-2 μg/ml have the stimulating effect. Thiamine distinctly shortened the lag phase of growth

(about 72 hours after inoculation) but did not influence the intensity of decomposition itself.

Cobalamin both influenced the duration of lag phase and the intensity of decomposition. The growth was visible after 72 hours and the maximal decomposition was reached already after 12 days, amounting to 47 per cent. Larger than usually areas of filter paper above the liquid were invaded by the microorganism; a visible decomposition took also place on the filter paper immediately below the liquid, and the margin of the decomposition zone was not as sharp as in standard conditions. Cobalamin caused also the intensification of the pigment formation in the decomposition area and heightened the stability of this pigment. Higher doses of cobalamin, however, delayed somewhat the growth, but the decomposition of cellulose was as intensive as before, and its maximum reached about 47 per cent. The addition of thiamine and cobalamin together acted as cobalamin alone. The stimulating action of vitamins was visible only if they were introduced to the medium before inoculation with bacteria. The addition of vitamins 24 hours after inoculation, did not cause any changes in the process. The low doses of yeast extract did not act at all. The dose 1.5 ml retarded somewhat the growth, but it did not influence the intensity of decomposition. The enrichment with amino acids, both each separately or in a mixture (20 μg of each ml) did not influence the activity of *Sporocytophaga*. The addition of the ash from associating bacteria or from the bacterial filtrate did not influence neither growth nor the activity of *Sporocytophaga*. Thiamine and cobalamin, however, had no influence on the transformation of the long forms into the microcysts. The rate of transformation and the quantitative relationship between microcysts and the long forms were similar to these observed on the standard medium.

THE INFLUENCE OF MEDIUM MODIFICATION

The replacement of $NaNO_3$ with KNO_3, enrichment with Ca^{++}, quantitative modifications, supplement of microelements, both in a mixture or separately (Mn, B, Mo, J, Zn, Co) did not influence the course of decomposition. (The experiments with microelements do not, however, authorize to any statement because the filter paper, as well as the distilled water and glass were not analytically pure). The influence of nitrogen on the growth of *Sporocytophaga* and cellulose decomposition is presented in the Table I. The concentration of nitrogen was equal to the concentration of N in the standard medium.

THE INFLUENCE OF AERATION

The slow passing of air through the medium did not increase the intensity of cellulose decomposition and the filter paper below the surface

Table I

The influence of the nitrogen source on cellulose decomposition
Wpływ źródła azotu na rozkład błonnika

Source of nitrogen Źródło azotu	Decomposition of cellulose Rozkład błonnika	Source of nitrogen Źródło azotu	Decomposition of cellulose Rozkład błonnika
$NaNO_3$ (standard)	+++	Yeast extract	0
Alanine	+	Urea	0
Asparagine	+	$NaNO_2$	0
Glycine	+	$(NH_4)_2SO_4$	++
Glutamine	0	NH_4Cl	++
Tryptophane	0	NH_4NO_3	++
Peptone	0		

The duration of experiment — 30 days
+++ intensive decomposition
++ good decomposition
+ poor decomposition
0 no decomposition

of the liquid was not visibly attacked by bacteria. With intensive aeration (liquid in motion) the decomposition was distinctly retarded. When aeration was started immediately after inoculation no growth was observed. If shaking was started after 4 days of incubation the decomposition was usually lower than in stationary cultures.

THE INFLUENCE OF OTHER CARBOHYDRATES

Sporocytophaga could grow on the standard medium in which cellulose is replaced by cellobiose in the concentration up to 1.5 per cent, with glucose to 1.2 per cent, mannose to 1.5 per cent, and maltose to 1 per cent. It did not grow on arabinose, fructose, galactose, und sucrose (the growth was estimated by turbidity of the medium and by microscopic examination).

The bacteria transferred for a longer period through the liquid medium containing other carbohydrates did not loose their cellulolytic properties. In agar media the concentration of sugars had to be much lower however: maximal concentration of glucose — 0.5 per cent, mannose and maltose — 0.7 per cent. Cellobiose was tolerated in the concentration of 1 per cent. After 3-4 passages on the solid medium containing these carbohydrates, the bacteria degenerated loosing their ability to grow both on cellulose and other carbohydrates. The cells became somewhat thicker and less elastic. Only a few cells transformed into microcysts. The destructive action of sugars in the agar medium,

in the agar-carbohydrate complex, or in any other growth conditions on the solid medium, could be observed even after a very careful purifying of the agar.

The enrichment of the standard medium with glucose to the concentration of 0.3 per cent did not influence the decomposition of cellulose. After 24-36 hours glucose was completely utilized by bacteria, and the medium was somewhat turbid. The symptoms of growth on the filter paper could be seen after 4 days and the decomposition was similar to that in standard conditions. The concentration of 0.3-0.7 per cent retarded the development of growth on the filter paper: growth was visible 24-96 hours later, although the growth rate of bacteria in the liquid was the same as with lower concentrations. The effect of the inhibition of growth lasted for 12-16 days and the amount of cellulose decomposed during this time did not exceed 16 per cent. After this period the intensity of decomposition increased, and after further 10-15 days reached its maximum, similar to the standard conditions. Concentrations above 0.7 per cent of glucose fully inhibited the growth of bacteria on the filter paper. In all experiments on the influence of glucose upon the decomposition of cellulose the marked oscillation between individual samples was observed. Only the results from the last days of experiments were statistically confirmed. There was one element common to all of the samples, however: the growth on the filter paper could be observed only after the disappearence of reducing sugars in the medium.

Neither the inoculation of mixed culture, nor the supplement of cobalamin and thiamine removed the inhibitive effect of glucose. The stimulating action of vitamins and the associating bacteria described before, did not appear in the medium with glucose. All sugars were made by NBCo. Glucose from other sources was also used but its activity was similar to the described one.

THE ACTIVITY OF ENZYME PREPARATION

The experiments described below are only preliminary in character. The positive reaction with the Benedict's reagent indicated the enzymatic activity. Active enzyme preparation was obtained as follows: discs of filter paper were placed on the silica gel saturated with mineral medium, and inoculated with *Sporocytophaga.* After 10 days of incubation the slime and bacteria were collected from the surface of the discs. In such conditions the fraction of microcysts in proportion to the total number of cells represented about 20 per cent. The slime was dissolved in physiological saline solution containing toluene, thoroughly shaked, left for 2 hours and centrifuged. This procedure was repeated twice. The sediment

was then mixed with the buffer at $pH = 8$ (0.2M KH_2PO_4 + 0.2M NaOH). For 1 g of moist sediment 5 ml of buffer were used, and the mixture frequently mixed was stored under toluene in 25°C for 24 hours and centrifuged again.

The test of the enzymatic activity of liquid and sediment (each successive fraction was examined), made with the filter paper and cellophane as the substrates, gave negative results. The enzymatic activity of the preparation could be yet observed on the cotton fibres. The cotton fibres, after the removal of fat and thorough cleaning, were moistened, mixed with the sediment ("bacterial preparation") or saturated with "buffer extract" and placed in the Petri dish on a layer of glass beads. The sediment did not show any enzymatic activity. In the "buffer extract", pressed from the cotton after 5 hours of incubation at 35°C the reducing substances were detected. The double concentration of the extract in room temperature, had similar effect (reducing substances could be detected after somewhat shorter incubation). The activity of the preparation was equally strong at *pH* range 6.8-8.5. The enzyme preparation produced from bacteria grown on the medium enriched with cobalamin and thiamine was not more active that the one from the standard medium. An active enzyme preparation was obtained only from the growth with absolute domination of long forms. It was impossible to obtain an active preparation from the old culture where many microcysts have been formed.

Microscopic examination of the "buffer extract" has shown the presence of autolysed cells and microcysts. No living bacteria were detected (by plate method). In steril conditions the enzyme preparation preserved its activity for about 2 years. Heating at 45°C for 30 minutes inactivated the preparation completely.

THE INTERMEDIATE PRODUCTS OF DECOMPOSITION

The course of research was intentionally limited to the investigation whether glucose is the product of cellulose decomposition. The experiments were made on the standard medium, replacing the flasks with test tubes and at the same time reducing the amount of mineral medium and filter paper. The size of inoculum was the same. The first sample was taken 12 hours after inoculation, others at different intervals during 30 days. The content of the test-tube was heated in the water bath to 40°C and shaked thoroughly in order to pass into solution any substances that might be adsorbed on the filter paper or in the slime. The liquid was filtered through the porous glass filter and proteins were removed immediately afterwards. The filtrate was examinated chromatographically. At the same time in a part of the sample, the degree of filter paper

decomposition was determined. The period between heating the sample, and investigating it never exceeded 12 hours. Totally 680 samples were investigated.

On 74 chromatograms the spots that might be identified as glucose were found. Neither the regularity in glucose appearence, nor the correlation between the degree of cellulose decomposition and the presence of glucose could be observed.

It may be taken for granted, however, that glucose never appeared in the samples before the perceivable decomposition of the filter paper took place. Besides, glucose has been found in different stages of decomposition, including the maximum.

In order to make the picture more expressive it is necessary to present the following: the experiment described above was made in summer 1957. It was repeated after 6 months on a smaller scale (200 test-tubes) but with similar results, i. e., glucose was detected in 13 per cent of test tubes. No regularity of this phenomenon could be found, however. In 1959 preparations were made for the replication of this experiment in more precisely stabilized growth conditions. The program, however, could not be realized because the strain grown for 2 years in the liquid medium containing filter paper, although has preserved its ability for cellulose decomposition, decomposed it in such a manner that in no sample (no matter when it was taken) the presence of glucose could be determined. (This preliminary investigations were made in 200 individual test tubes and in a series of flasks containing 250 ml. of medium in which it was intended to investigate the rate of glucose (if any) transformation by bacteria).

RESULTS AND DISCUSSION

The differences between the characteristics of our strain and the descriptions of *Sp. myxococcoides* (often contradictory) given by other authors do not refer to the basic characters, and therefore do not authorize the creation of a new species. These differences once more confirm the variability and strain heterogenicity observed by other authors. The differences in tolerance to various carbohydrates, the requirements for nitrogen or supplementary substances deserve special attention. The cellulase of different strains is adsorbed on the cell surface with different strength. This conclusion is based on the observation that the effort to obtain the enzyme preparation using the methods described by Ayers (1958), Fåhreus (1946), and Zarembska (1936) were not successful with our strain, and the enzyme could be neither extracted nor its presence in the cell preparation could be observed. The differences in strength of

the bond between enzyme and the cell may by the explanation of this phenomenon.

It was very difficult to obtain the pure culture. This observation is contradictory to the informations given by some authors (Fåhreus, 1947, Thomas, 1958, Żukowa, 1959, and others). The problem of purity of the investigated strains in the light of my experiments deserves special discussion. All the experiments described above were made using the strain that at first, according to criteria accepted, was considered pure. The purity was confirmed during the control of successive passages. For the final control some of the flasks were left for longer time. The control of purity made after 8 months has shown the presence of contaminating bacteria, identical to the organism growing with *Sporocytophaga* before it was considered pure. Thus, once more a new experiment with a large number of well protected from contamination flasks was arranged. The control plates with nutrient broth were poured every month, beginning 3 months after inoculation. During the first 3-5 months no contamination could be observed. After 6 months all the flasks were contaminated. The generality of the case seems to exclude the accident.

It seems that the efforts to purify the strain, considered as sufficient, have only reduced the number or vitality of associating bacteria so, that for some time their presence could not be detected with methods used. The conditions formed during the long growth of *Sp. myxococcoides* on the filter paper either made the development of associating bacteria possible, or have regenerated its vitality. It has to be added that the number of contaminating bacteria was very small. The microscopic examination of unstained smears, prepared from an old culture did not allow the identification of associating bacteria from among the mass of microcysts and autolysed *Sporocytophaga*. In the stained smears prepared from the old cultures considered as pure, the single cells of the associating bacteria could be found. In the light of this observation it is to be stated that our research was made, using a relatively pure culture not showing the presence of contamination during the experiments. It seems, however, that such minute contaminations could not influence the results of the short-lasting experiments.

It also seems that the purity of strains with which other authors were working, should be discussed.

The diagnostic characters of the associating bacteria seem to indicate that it is a representative of the genus *Cellulomonas* which has lost its ability to decompose cellulose. The efforts made to reactivate the cellulolytic activity by passaging it in soil and manure did not give positive results.

In order to obtain an uniform growth of *Sporocytophaga* on the filter

paper, in the conditions of our experiment, it is necessary to inoculate the substrate with a large number of bacteria. Our observations indicate that the immediate activity of living bacteria, and not the influence of their enzymes or metabolites is the decisive factor here: the inoculation with a lower dose of bacteria and simultaneous introduction of cell-free filtrate of *Sporocytophaga* and enzymatic "buffer extract" did not make possible the course of growth similar to the one obtained with a large inoculum.

Many workers were making efforts to show that glucose is an intermediate product of cellulose decomposition by aerobic microorganisms. Among others, Imszeniecki (1938) interrupting the access of air to the culture was able to stop the growth of *Vibrio vulgaris* without the destruction of cellulase activity. In such conditions the reducing substances accumulating in the substrate could be quantitatively determined. Analogical experiment with *Sp. myxococcoides* made by Imszeniecki (1938) has shown only traces of reducing substances. Fåhreus, who has proved the formation of glucose under the influence of enzyme preparation, did not found the presence of reducing substances in the experiment with living *Cytophaga*. In numerous cases during our experiments we were able to identify glucose as the intermediate product of cellulose decomposition by *Sp. myxococcoides*. The view obtained, has been dimmed by the negative results from the experiment in 1959. In the light of experimental data, the efforts to explain the failures in 1959 may be only hypothetical. One of the possible interpretations may be the supposition that during 2-year growth in laboratory, the strain has undergone transformations which have changed the dynamics of metabolism of the intermediate decomposition products. The differences in the rate of glucose formation and transformation caused by different strains could, to some extent, explain the differences between the results published by different authors. It seems that the explanation of this process could be possible in the experiment made in strictly standarized conditions of a continuous culture, from which the samples for analysis would be taken at very short time intervals.

The experiments described here should be considered as preliminary. Nevertheless, the number of positive results obtained in two mass experiments in 1957 authorizes expression of the view that the formation of glucose as the intermediate product of cellulose decomposition by *Sp. myxococcoides* has been proved.

LITERATURE

Ayers, W., 1958: Phosphorylation of cellobiose and glucose by *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Bact.*, **76** : 515.

Bergey's Manual of determinative bacteriology, 1957, 7th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Dubos, R. J., 1928: The decomposition of cellulose by aerobic bacteria. *J. Bact.*, **15** : 223.

Fåhreus, G., 1941: Wirkung von Glukose auf die Zellulosezersetzung einiger *Cytophaga*-Arten. *Zentr. Bakter. II.*, **104** : 264.

Fåhreus, G., 1946: Enzyme preparations from cellulose decomposing bacteria. *Experientia*, **2** : 413.

Fåhreus, G., 1947: Studies in the cellulose decomposition by *Cytophaga*. *Symb. Botan. Upsalienses*, **9** : 2.

Gutgisser, A., 1936: O aerobowym rozkładzie celulozy pod wpływem czystej hodowli *Cytobacter polonicum*. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **13** : 327.

Hutchinson, H. B. and Clayton, J., 1919: On the decomposition of cellulose by an aerobic organism (*Spirochaeta cytophaga n. sp.*). *J. Agric. Sci.*, 9 : 143.

Imszeniecki, A., 1938: Gidroliz cellułozy aerobnymi baktierijami. *Mikrobiołogija*, **7** : 683.

Kalninš, A., 1930: Aerobic soil bacteria that decompose cellulose. *Act. Univ. Latviensis*, ser. I. **11** : 221.

Krasilnikow, N. A., 1949: Opriedielitiel baktierij i aktinomicetow. Izd. AN SSR. Moskwa.

Krzemieniewska, H., 1930: Le cycle évolutif de *Spirochaeta cytophaga* Hutchinson et Clayton. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **7** : 507.

Krzemieniewska, H., 1933: *Spirochaeta cytophaga* Hutch. i Clayt. oraz *Cytophaga hutchinsoni* Winogradski (Studium porównawcze). *Roczn. Nauk. Roln. Leśn.*, **30** : 1.

Pringsheim, H., 1909: Über die Verwendung von Cellulose als Energiequelle zur Assimilation des Luftstickstoffs. *Zentr. Bakter. II.*, **23** : 300.

Pringsheim, H., 1912: Über den fermentativen Abbau der Cellulose. *Ztschr. Phys. Chem.*, **78** : 266.

Pringsheim, H., 1920: Der biologische Abbau der Zellulose. *Angew. Bot.*, **2** : 217.

Stanier, R., 1940: Studies on the cytophagas. *J. Bact.*, **40** : 619.

Stanier, R., 1942[a]: Are there obligate cellulose decomposing bacteria. *Soil. Sci.*, **53** : 479.

Stanier, R., 1942[b]: The *Cytophaga*-group: a contribution to the biology of *Myxobacteria*. *Bact. Rev.*, **6** : 143.

Śnieszko, S., 1934: Doświadczenia nad bakteriami rozkładającymi błonnik w warunkach tlenowych. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **11** : 51.

Thomas, O. E. and Bell, R. E., 1958: Isolation study of soil cytophagas. *Trans. Cansas Acad. Sci.* **58** : 528 (report in *Refer. Żurn.*, 1957, 5).

Zarembska, R., 1936: Rozkład aerobowy celulozy przez *Cellulobacillus varsaviensis*. *Acta Soc. Botan. Polon.*, **13** : 355.

Żukowa, R. A., 1959: Rasprostranienije aerobnych cellułoznych baktierij w poczwach kolskogo połuostrowa. *Mikrobiołogija*, **28**, **1** : 69.

Adam Drozdowicz

BADANIA NAD ROZKŁADEM BŁONNIKA PRZEZ MIKSOBAKTERIE Z RODZAJU *SPOROCYTOPHAGA*

Streszczenie

Badania prowadzono nad drobnoustrojem wyizolowanym z obornika, oznaczonym jako *Sporocytophaga myxococcoides*. Podano cechy odróżniające badany szczep od szczepów opisanych przez innych autorów. Kontrola czystości, prowadzona przyjętymi metodami, nie ujawniała zanieczyszczeń w czasie trwania doświadczeń. Natomiast długotrwałe uzupełniające badania wykazały obecność niewielkich ilości bakterii zanieczyszczających w starych hodowlach.

Zbadano wpływ szeregu czynników na rozkład celulozy przez *Sp. myxococcoides*. Stwierdzono, że duży wpływ wywiera wielkość dawki szczepiennej. Stymulujące działanie wywierała bakteria zanieczyszczająca, a także przesącz bezkomórkowy z jej hodowli. Spośród zbadanych witamin stymulująco działała tiamina w stężeniach $>$ 1 µg/ml oraz kobalamina w stężeniach 0,05-2 µg/ml. Bakteria najlepiej wykorzystuje azot saletrzany. Rozwija się również na solach amonowych. Znacznie słabiej korzysta z alaniny, asparaginy i glicyny. Nie wykorzystuje azotu zawartego w glutaminie, tryptofanie, peptonie, wyciągu drożdżowym i mocznika. Sporocytofaga rozwija się na pożywce z celobiozą w stężeniach do 1,5%, glikozą — do 1,2%, mannozą — do 1,5% i maltozą — do 1%. Nie rozwija się na arabinozie, fruktozie, galaktozie i sacharozie. Dodatek glikozy w stężeniach do 0,3% nie wpływał na intensywność rozkładu celulozy. Stężenia glikozy 0,3-0,7% hamowały, a stężenia wyższe uniemożliwiały rozwój bakterii na bibule.

Przygotowano bezkomórkowy preparat enzymatyczny, przy pomocy którego stwierdzono powstawanie przy enzymatycznym rozkładzie celulozy (włókna bawełniane) substancji redukujących.

W doświadczeniach z żywymi bakteriami stwierdzono, metodą chromatografii bibułowej, powstawanie glikozy jako pośredniego, przejściowego produktu mikrobiologicznego rozkładu celulozy.

Author's address:
Adres autora:
Doc. A. Drozdowicz,
Katedra Mikrobiologii Rolnej SGGW,
Warszawa, Rakowiecka 8,
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 271—286

Janina Niewiarowska

MORPHOLOGIE ET PHYSIOLOGIE DES *ACTINOMYCETES* SYMBIOTIQUES DES *HIPPOPHAE*

Institut de Physiologie Végétale à l'Université de Varsovie
Manuscrit reçu le 15 mars 1961

Résumé

On a élaboré une méthode d'isolement des *Actinomycetes* symbiotiques des nodules des *Hippophae*. On a examiné la morphologie des souches isolées et on les a définies d'après ces caractères comme *Nocardia hippophae*. On a étudié la capacité des souches symbiotiques d'utiliser diverses sources de carbone et d'azote. On a établi le *pH* optimum pour eux à environ 7, la température optima de 22-27°C. On a constaté que parmi deux souches réisolées à partir des nodules l'une ressemblait à la souche maternelle, l'autre avait quelques caractères différents.

La place qu'occupent dans la systématique les microorganismes symbiotiques des plantes n'appartenant pas aux papilionacées, mais aux genres: *Alnus, Elaeagnus, Myrica* et *Hippophae* — n'a pas été definitivement précisée. Les premiers chercheurs les ont classés parmi les champignons filamenteux — Woronin (1866), Brunchorst (1885) et Frank (1895) — ou parmi les *Plasmodiophorales* — Warming (1876), Möller (1885). Hiltner (1896) a voulu classer ces microorganismes parmi les bactéries. Bottomley (1906) et Spratt (1912) les croyaient pareils aux *Rhizobium*, ce que confirmaient plus tard Virtanen et Saastamoinen (1936). D'après Shibata (1902), ainsi que Maire et Tison (1909) les microorganismes symbiotiques de ces plantes doivent être classés parmi les *Actinomycetes*. Peklo (1910) a isolé les microorganismes des nodules des aunes et les a nommés *Actinomyces alni*. En accord avec la description de v. Plotho (1940 a et b, 1941) les souches de microorganismes isolées des *Alnus* devraient être classées parmi les *Streptomyces*. Aussi selon l'avis de Krebber (1932) et de Schaede (1948) ces organismes symbiotiques sont des

Actinomycetes. Cependant, vu les difficultés qu'on a à isoler les microorganismes symbiotiques et à infecter des plantes avec des souches isolées, nombre d'auteurs exprimaient des avis différents dans des publications qui continuaient à paraître. Hawker et Fraymouth (1951) ont de nouveau classé ces organismes parmi les *Plasmodiophorales* et Quispel (1954) parlait de leur nature toujours inconnue.

Les recherches de Bond (1955 et 1956) avec les isotopes ont démontré définitivement que la symbiose chez les *Alnus* avait pour résultat la fixation de l'azote atmosphérique. Pommer (1956), Taubert (1956), ainsi que Käppel et Wartenberg (1958) ont donné une description histologique précise de la formation du nodule et de la pénétration de l'hype infectant dans le poil absorbant de la racine. Pommer a isolé les *Actinomycetes* symbiotiques des *Alnus*, mais n'a pas réussi à infecter des plantes avec ces souches.

Les organismes symbiotiques des *Hippophae* n'étaient pas jusqu'à présent isolés et définis. Roberg a constaté en 1934 que les organismes provenant des nodules broyés des *Alnus spp.* n'étaient pas capables d'infecter des espèces du genre *Elaeagnus* et *Hippophae* et inversement.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

ISOLEMENT DES MICROORGANISMES SYMBIOTIQUES

Matériel

Les microorganismes symbiotiques étaient isolés des nodosités cueillies le même jour sur les racines d'argoussier. Dans des essais ultérieurs j'employais des nodosités formées dans mes propres expériences par les plantes infectées dans des vases. Il faut souligner que dans quelques cas je n'ai pas réussi à isoler des organismes symbiotiques même à partir des nodosités qui avaient un aspect tout à fait sain.

Méthode

Dans l'élaboration de la méthode je me suis basée sur les expériences de Peklo v. Plotho et Pommer. J'ai constaté que les méthodes de désinfection de la surface nodulaire employées par ces auteurs étaient insuffisantes. Dans mes propres épreuves j'employais de la solution aqueuse de brome à 1% pendant 10 minutes. J'ai choisi comme la plus avantageuse méthode d'inoculation celle de broyer les nodules avec une baguette stérilisée dans une boîte de Pétri et d'y verser ensuite du milieu gélosé liquefié (Peklo) ou celle d'inoculer avec du matériel provenant des nodules broyés dans un mortier (Pommer). L'inoculation avec du matériel d'un nodule coupé (v. Plotho) ne donne pas de bons résultats, car les organismes symbiotiques forment dans les cellules de la plante-hôte des masses compactes, ce qui fait qu'avec ce genre de technique, si on arrive même à avoir des colonies, elles sont très peu nombreuses.

Les milieux employés par les auteurs cités ci-dessus se sont montrés dans la plupart des cas mal choisis pour l'isolement. Dans mes propres expériences j'employais donc les milieux suivants:

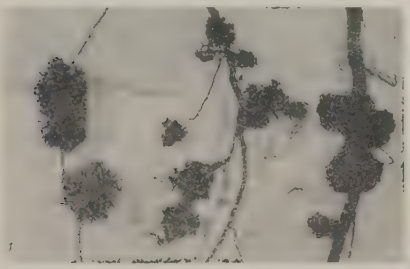
1) glucose 10,0 g, asparagine 0,1 g, HPO_4K_2 0,5 g, $SO_4Mg \cdot 7\ H_2O$ 0,1 g, ClNa 0,1 g, citrate de fer 0,005 g, CO_3Ca 0,5 g, gélose 15,0 g, eau distillée 1000 ml.

2) amidon 10,0 g, HPO_4K_2 0,8 g, H_2PO_4K 1,1 g, $SO_4Mg \cdot 7\ H_2O$ 0,2 g, ClNa 0,05 g, citrate de fer 0,005 g, $Cl_2\ Ca \cdot 2\ H_2O$ 0,2 g, gélose 15,0 g, eau distillée 1000 ml.

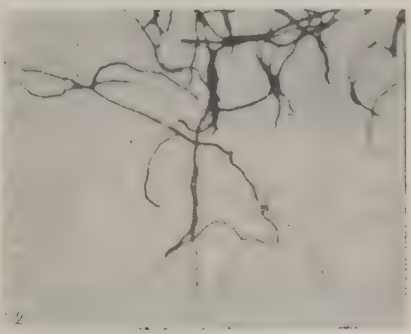
Le *pH* des milieux était environ 7.

MORPHOLOGIE DES ACTINOMYCETES SYMBIOTIQUES

La description morphologique des *Actinomycetes* symbiotiques est basée sur des observations au microscope de trente souches, cultivées sur des milieux divers, examinées vivantes dans une goutte d'eau ou fixées et colorées par la méthode de Gram.



Phot. 1



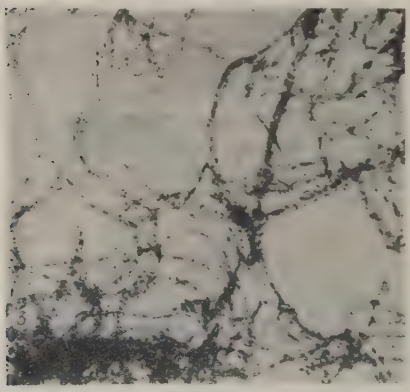
Phot. 2

Phot. 1. Aspect général des nodosités des *Alnus*, *Elaeagnus* et *Hippophae*
Fot. 1. Ogólny wygląd brodawek *Alnus*, *Elaeagnus* i *Hippophae*

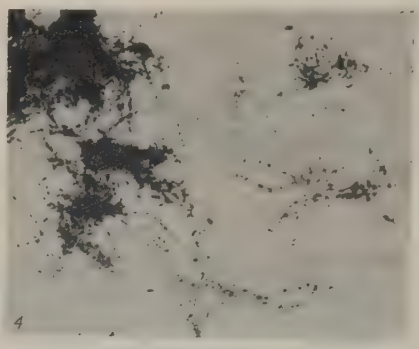
Phot. 2. Culture de 3 jours des *Actinomycetes* symbiotiques sur gélose à l'amidon (agr. 1000 ×)
Fot. 2. 3-dniowa hodowla promieniowców symbiotycznych na agarze ze skrobią (pow. 1000 ×)

Sur un milieu avec de l'amidon et sans azote ces microorganismes forment dans les premières phases de croissance des filaments de 0,7-0,9 μ de diamètre, peu ramifiés, et renflés par endroits. Ces renflements se forment le plus souvent sur les extrémités des filaments, mais on les trouve aussi à l'intérieur des hyphes. Chez quelques-unes des souches ces renflements sont peu accentués et apparaissent seulement dans les cultures âgées, — chez les autres ils atteignent un volume considérable et sont visibles déjà dans les premiers jours de culture. Les hyphes de jeune mycélium sont uniformement nettement Gram-positives

(phot. 2). Le troisième jour de culture quelques hyphes deviennent plus épaisses et remplies de petites granules Gram-positives qui se dégagent des hyphes, croissent et après quelques jours donnent des formes bacillaires longues environ de 3 μ (phot. 3, 4, 5).



Phot. 3



Phot. 4

Phot. 3. Culture de 5 jours des *Actinomycetes* symbiotiques sur gélose à l'amidon (agr. 1000 ×)

Fot. 3. 5-dniowa hodowla promieniowców symbiotycznych na agarze ze skrobią (pow. 1000 ×)

Phot. 4. Culture de 7 jours des *Actinomycetes* symbiotiques sur gélose à l'amidon (agr. 1000 ×)

Fot. 4. 7-dniowa hodowla promieniowców symbiotycznych na agarze ze skrobią (pow. 1000 ×)

Les lipides sont aussi abondamment produits.

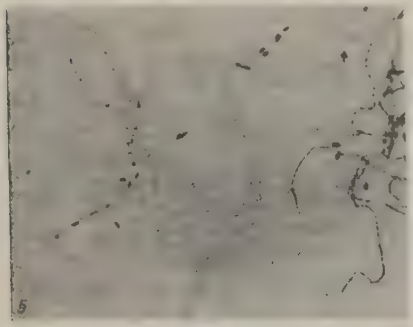
L'élaboration des formes bacillaires commence chez quelques souches dès le quatrième jour, cependant chez d'autres le cycle de l'évolution est plus lent et elles n'apparaissent que le dixième jour.

Ces formes bacillaires, transportées sur un milieu de culture frais, germent sur un pôle (phot. 6). Ensuite l'évolution de l'hyphe ressemble à celle qui a lieu dans la culture sur milieu gélosé (phot. 7).

Dans des cultures âgées on trouve des formes d'involution. Les hyphes se divisent en morceaux plus courts et sont irrégulièrement renflées. Sur milieux pauvres les formes d'involution apparaissent aussi — courtes, arrondies, semblables aux vésicules des nodules.

Sur milieu avec du glucose et du peptone les hyphes se segmentent en morceaux plus courts, dans lesquels probablement dépérissent les membranes cellulaires et se forment de grandes quantités de fines

granules (phot. 8). Après quelques jours apparaissent des formes bacillaires (phot. 9). Quelques souches ne produisent pas de formes bacillaires sur ce milieu.



Phot. 5

Phot. 6

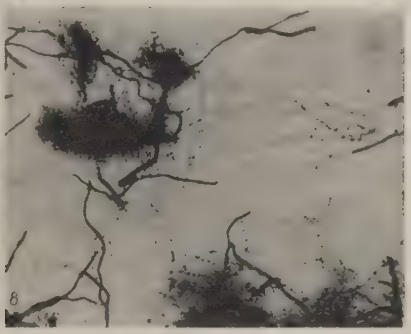
Phot. 5. Culture de 10 jours des *Actinomycetes* symbiotiques sur gélose à l'amidon (agr. 1000 ×)

Fot. 5. 10-dniowa hodowla promieniowców symbiotycznych na agarze ze skrobią (pow. 1000 ×)

Phot. 6. Germination d'une forme bacillaire. Culture de 2 jours (agr. 1000) ×

Fot. 6. Kiełkowanie formy pałeczkowatej. Hodowla 2-dniowa (pow. 1000 ×)

Phot. 7



Phot. 8

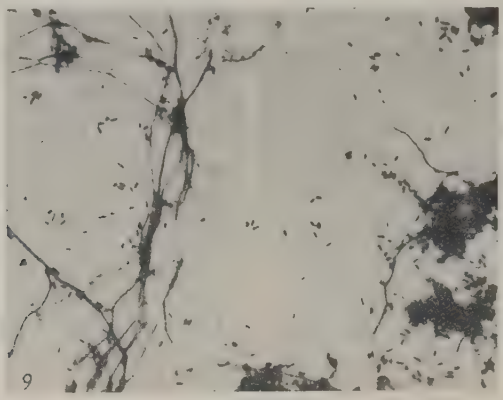
Phot. 7. Culture de 5 jours des *Actinomycetes* symbiotiques provenant d'une forme bacillaire. On voit les renflements des hyphes (agr. 1000 ×)

Fot. 7. 5-dniowa hodowla promieniowców symbiotycznych z formy pałeczkowatej. Widoczne nabrzmienia nici (pow. 1000 ×)

Phot. 8. Culture de 5 jours des Actinomycetes symbiotiques sur gélose à l'amidon et au peptone (agr. 1000 ×)

Fot. 8. 5-dniowa hodowla promieniowców symbiotycznych na agarze ze skrobią i peptonem (pow. 1000 ×)

Les colonies apparaissent le troisième jour après l'inoculation. Les jeunes colonies sont compactes, difficiles à prélever du milieu, lisses. Avec le temps elles deviennent plissées, de consistance pâteuse ou friable. Chez quelques souches les colonies se couvrent d'une couche



Phot. 9

Phot. 9. Culture de 10 jours des *Actinomycetes* symbiotiques sur gélose à l'amidon et au pepton (agr. 1000 ×)

Fot. 9. 10-dniowa hodowla promieniowców symbiotycznych na agarze ze skrobią i peptonem (pow. 1000 ×)

poudreuse, blanche ou grise, chez d'autres elle est peu abondante ou il n'y en a pas. Il y a des souches incolores, d'autres élaborent des pigments jaune, d'un rouge, orange, ou brun. La production du pigment dépend pour une grande part des conditions de culture.

QUELQUES CARACTÈRES PHYSIOLOGIQUES DES *ACTINOMYCETES* SYMBIOTIQUES

Matériel

Les expériences ayant pour but la détermination des caractères physiologiques des *Actinomycetes* symbiotiques étaient faites avec trois souches: *4*, *4a* et *4b*. La souche *4* avait servi à infecter des plantes dans les vases de végétation (Niewiarowska, 1959). Cette souche sécrétait un pigment brun. Au cours du réisolement à partir des nodules j'ai obtenu dans une boîte de Pétri une majorité de colonies blanches et deux colonies au pigment brun. J'ai isolé les deux souches et nommé la souché blanche *4a* et la souche brune *4b*. En étudiant les caractères de ces souches je voulais en même temps examiner jusqu'à quel point elles ressemblent à la souche maternelle.

Méthode

Je cultivais ces souches dans le milieu de base suivant: HPO_4K_2 0,2 g, H_2PO_4K 0,3 g, $SO_4Mg \cdot 7\ H_2O$ 0,2 g, citrate de fer 0,005 g, ClNa 0,05 g, $Cl_2Ca \cdot 2\ H_2O$ 0,02 g, eau distilée 1000 ml — auquel étaient ajoutés des glucides et des composés azotés.

Le milieu était versé par lots de 50 ml dans des flacons de 250 ccm de volume. J'ensemençais ces flacons avec du matériel provenant des cultures sur milieu gélosé, âgées de 5 jours, en répétant trois fois chaque combinaison. La température d'incubation était 27°C. Après trois semaines j'examinais la matière sèche du mycélium, le *pH* final de la culture et l'élaboration de pigment. Les résultats donnés sont moyens.

1. La capacité d'utiliser diverses sources carbonées était examinée sur milieu de base avec addition de 5,0 g de NO_3K et de 10,0 g par litre de divers glucides. Le *pH* du milieu était de 6,8, après la stérilisation le *pH* est devenu 7,2.

Les résultats sont exposés dans le tableau I.

Il résulte de ce tableau que les souches examinées sont capables d'utiliser tous les glucides donnés. Parmi les alcools, le mannitol s'est montré une excellente source carbonée, le glycérol un peu plus faible et sur le sorbitol et le dulcitol les souches ne poussaient pas. La quantité de matière sèche était en général semblable pour les souches *4* et *4b*, quand à la souche *4a* il y avait quelque différence.

Avec tous les glucides on notait l'élévation de *pH* du milieu à la fin de la culture, on peut donc constater une oxydation complète des glucides sans formation d'acides. L'intensité de l'élaboration du pigment est en principe liée avec l'utilité de la source de carbone pour les microorganismes, mais cette dépendance n'est pas stricte. Il y a des substances, p. ex. le glycérol, sur lesquelles l'élaboration du pigment est la plus intense, malgré une croissance plus faible que sur d'autres sources carbonées, p. ex. sur le ramnose qui a donné presque deux fois plus de matière sèche.

La souche *4a*, blanche dans les cultures sur gélose à l'amidon, sur d'autres substances, p. ex. le fructose ou le mannitol, élaborait du pigment.

2. Pour l'examen de l'utilisation des diverses sources d'azote j'employais le milieu de base dans lequel les phosphates étaient remplacés par la solution-tampon de phosphates de Sörensen diluée à demi. Comme source carbonée on ajoutait 10,0 g l de glucose. Les composés azotés étaient donnés en quantité de 0,1 g d'azote par 100 ml de milieu. Le *pH* du milieu stérilisé était de 6,8.

Les résultats sont exposés dans le tableau II.

Parmi les sources d'azote examinées les nitrates sont bien utilisés. En cas de nitrate d'ammonium c'est l'ion ammoniacal qui est utilisé en premier lieu. Les nitrites ne sont pas utilisables par les *Actinomycetes* symbiotiques.

Quant aux sels ammoniacaux la meilleure croissance était observée sur du carbonate d'ammonium. Sur de l'acétate d'ammonium les souches

Tableau I

Capacité des *Actinomycetes* symbiotiques d'utiliser diverses sources carbonées
Zdolność promieniowców symbiotycznych do korzystania z różnych źródeł węgla

Source carbonée	Souche	Matière sêche de mycélium en mg	*pH* final	Elaboration de pigment
Arabinose	*4*	60,5	7,1	+
	4a	99,5	8,4	±
	4b	72,0	7,0	++
Xylose	*4*	62,0	8,0	+
	4a	61,5	8,0	±
	4b	70,5	8,1	+
Ramnose	*4*	100,3	8,1	++
	4a	118,5	8,4	±
	4b	106,5	8,0	++
Glucose	*4*	79,5	8,2	++
	4a	69,0	8,2	±
	4b	86,2	8,2	++
Galactose	*4*	92,5	8,2	+
	4a	72,5	8,2	±
	4b	84,0	8,2	+
Fructose	*4*	99,0	7,9	++
	4a	72,0	8,0	+
	4b	82,0	8,0	++
Maltose	*4*	47,5	7,5	+
	4a	76,5	7,8	–
	4b	49,5	7,7	±
Saccharose	*4*	98,0	8,1	++
	4a	62,0	8,0	±
	4b	111,0	8,1	++
Lactose	*4*	99,5	8,2	++
	4a	60,5	8,2	–
	4b	104,5	8,1	++
Dextrine	*4*	51,5	7,9	+
	4a	65,8	8,0	–
	4b	67,5	8,0	+
Amidon	*4*	95,0	8,2	++
	4a	86,0	8,2	±
	4b	98,0	8,2	++
Glycérol	*4*	55,0	8,0	+++
	4a	68,5	8,0	±
	4b	66,5	8,1	+++
Sorbitol	*4*	1,0	7,9	–
	4a	3,0	7,8	–
	4b	–	7,8	–
Mannitol	*4*	107,4	8,0	++
	4a	78,9	8,0	+
	4b	92,9	8,0	++
Dulcitol	*4*	3,0	7,4	–
	4a	2,5	7,2	–
	4b	–	7,4	–

Tableau II

Capacité des *Actinomycétes* symbiotiques d'utiliser diverses sources d'azote
Zdolność promieniowców symbiotycznych do korzystania z różnych źródeł azotu

Source d'azote	Souche	Matière sèche de mycélium en mg	*pH* final	Elaboration de pigment
NO_3K	4	80,5	7,4	++
	4a	70,0	7,8	+
	4b	75,5	7,3	++
NO_3NH_4	4	51,5	5,5	±
	4a	47,6	5,6	−
	4b	61,5	5,4	±
NO_2Na	4	1,0	6,7	−
	4a	0,5	6,7	−
	4b	2,0	6,7	−
$ClNH_4$	4	26,5	5,8	−
	4a	31,0	5,8	
	4b	24,0	5,7	−
$SO_4(NH_4)_2$	4	24,5	6,0	
	4a	41,0	5,5	−
	4b	56,5	5,6	−
$HPO_4(NH_4)_2$	4	53,5	6,4	+
	4a	77,5	6,5	
	4b	75,0	6,7	±
$CH_3COO(NH_4)$	4	1,5	6,7	−
	4a	1,0	6,7	−
	4b	0,5	6,7	−
$CO_3(NH_4)_2$	4	91,0	6,5	−
	4a	141,5	6,2	−
	4b	127,5	6,2	−
Urée	4	58,5	7,6	+
	4a	52,5	5,9	±
	4b	62,0	6,3	+
Glycocolle	4	86.0	6,2	++
	4a	68,0	6,2	−
	4b	72,0	6,2	++
l-alanine	4	87,5	6,6	++
	4a	76,0	6,3	−
	4b	81,5	6,6	++
Asparagine	4	65,5	6,4	++
	4a	120,0	7,2	+
	4b	76,5	6,6	++
Tyrosine	4	75,0	6,3	+
	4a	65,0	6,0	−
	4b	44,0	6,1	+
Peptone	4	45,5	5,9	+++
	4a	50,0	6,2	+++
	4b	50,5	6,1	+++

ne poussaient pas. J'ai vérifié alors si ce n'était pas l'ion acétique qui freinait la croissance. Dans ce but j'ai ajouté au milieu de base, contenant des solutions-tampon et du glucose, de l'acide acétique en quantité équivalente et du phosphate d'ammonium comme source d'azote. L'absence de croissance de toutes les trois souches montre que l'acide acétique exerce une action freinante.

L'urée est une bonne source d'azote, ainsi que tous les acides aminés examinés. Dans les cultures sur des acides aminés il y a une intense élaboration de pigment, surtout sur l'asparagine, sur laquelle même la souche *4a* élaborait du pigment. La plus intense production de pigment se montrait sur le peptone, bien que la quantité de matière sèche y soit en général plus petite que sur chaque acide aminé séparément. La souche *4a* élaborait sur ce milieu un pigment aussi intense que les deux autres souches. La plus faible coloration s'est montrée sur tyrosine.

3. Pour définir l'optimum de *pH* j'ai employé un milieu de base sans phosphates avec addition de 10,0 g de glucose et de 4,0 g d'asparagine par litre. J'ai réparti du milieu, deux fois concentré, par 25 ml dans des flacons et après la stérilisation j'y ai ajouté des lots de 25 ml de solution-tampon de Sörensen stérilisée et à *pH* convenable.

Les resultats sont exposés dans le tableau III.

Tableau III

Influence du *pH* sur la culture des *Actinomycetes* symbiotiques
Wpływ *pH* na wzrost promieniowców symbiotycznych

pH	Souche	Matière sèche de mycélium en mg	*pH* final	Elaboration de pigment
4,8	*4*	7,0	5,0	—
	4a	82,0	6,1	—
	4b	5,0	4,7	—
5,6	*4*	20,5	5,6	—
	4a	94,5	6,0	++
	4b	23,0	5,5	—
6,0	*4*	53,5	6,1	+
	4a	139,0	7,1	++
	4b	36,0	5,8	+
7,0	*4*	92,5	6,6	++
	4a	152,0	7,5	++
	4b	82,0	6,8	++
7,8	*4*	27,5	7,4	±
	4a	21,5	7,6	±
	4b	26,0	7,1	±

Dans cette expérience une grande différence s'est montrée entre la souche *4a* et lest autres souches. Dans l'expérience précédente la souche *4a* donnait sur milieu avec de l'asparagine deux fois plus de matière sèche que les souches *4* et *4b* — et entraînait une élévation de *pH*. Cette même souche a montré une beaucoup plus grande acido-tolérance.

L'optimum de *pH* pour toutes les souches était d'environ 7. À *pH* = 7.8 on remarquait une forte diminution de quantité de matière sèche de toutes les souches.

L'élaboration du pigment s'est montrée largement influencée par le *pH*. Elle est la plus intense à l'optimum de *pH*. Les souches *4* et *4b* élaboraient du pigment seulement à partir de *pH* = 6. La souche *4a* le faisait à *pH* = 5,6 et à *pH* = 6 la production était plus grande que celle de souches *4* et *4b*.

4. J'ai effectué une expérience ayant pour but la définition de l'optimum de température sur milieu de base avec addition de 10.0 g de glucose et de 4.0 g d'asparagine par litre. Le *pH* de milieu = 6,8.

Les résultats sont exposés dans le tableau IV.

Tableau IV

Influence de la témperature sur la culture des *Actinomycetes* symbiotiques
Wpływ temperatury na wzrost promieniowców symbiotycznych

Température en °C	Souche	Matière sèche de mycélium en mg	Elaboration de pigment
3	*4*	9,0	
	4a	10,0	
	4b	13,5	—
17	*4*	34,0	+
	4a	68,0	+
	4b	33,5	++
22	*4*	53,0	++
	4a	107,5	+
	4b	56,5	++
27	*4*	41,5	++
	4a	102,5	+
	4b	53,5	++
34	*4*	13,0	+
	4a	14,5	—
	4b	9,0	—
37	*4*	6,5	—
	4a	12,5	—
	4b	8,5	—

Il résulte de ce tableau que la température optima pour l'augmentation de matière sèche des *Actinomycetes* symbiotiques est entre 22 et 27°C. Dans les températures 3 et 34° il n'y avait presque plus de croissance. L'élaboration de pigment est la plus intense dans les températures proches de l'optimum.

DISCUSSION

Les résultats négatifs de l'isolement des souches symbiotiques (Hawker et Fraymouth, Quispel, Taubert) doivent être imputés à de mauvaises méthodes d'isolement. On ne doit pas non plus négliger le fait — dont la cause n'est pas encore connue — que ce n'est pas de tous les nodules qu'on peut isoler des microorganismes symbiotiques. Suivant l'analyse des méthodes employées par les auteurs qui ont réussi à isoler les souches symbiotiques des *Alnus*, et, d'après mes propres expériences, on peut considérer comme conditions indispensables d'une bonne méthode d'isolement:

1. Les nodules pris pour l'inoculation doivent être bien développés et fraîchement cueillis.

2. La stérilisation des nodules peut et doit être faite avec des désinfectants drastiques, parce que la microflore infectante est variée et contient entre autres des organismes très résistants aux agents chimiques et la couche corticale du nodule suffit pour le protéger contre la pénétration de l'agent à l'intérieur. Le désinfectant doit ensuite être entièrement elimine. La chauffage des nodules (Peklo, v. Plotho) ou l'emploi de desinfectants doux (v. Plotho, Pommer) conduit à l'infection par d'autres microorganismes, ce qui rend difficile ou même impossible l'isolement des *Actinomycetes* symbiotiques. Par contre, un rinçage peu exact pour éliminer un agent très toxique. — p. ex. le sublimé — peut causer un arrêt dans la croissance des organismes symbiotiques.

3. Le matériel employé pour l'inoculation doit être broyé le mieux possible pour libérer le microorganisme symbiotique des cellules de la plante-hôte.

4. L'isolement doit être réalisé depuis le commencement sur milieux gélosés (Peklo isolait sur mileux liquides). Le milieu outre les sels, employés en général dans des milieux microbiologiques, doit contenir surtout une quantité suffisante de carbone organique et par contre de très petites quantités de composés azotés, ce qui le rend partiellement sélectif. Les extraits de viande avec du peptone (employés par v. Plotho) agissent désavantageusement sur la culture des *Actinomycetes* symbiotiques et en même temps ne sont pas du tout sélectifs.

5. Les milieux employés pour l'isolement doivent être un peu acides. Le *pH* optimum est de 6 à 7 (Peklo employait des milieux très alcalins).

La diversité des formes prises par les microorganismes symbiotiques dans les cellules de la plante-hôte était aussi une cause de divergence d'opinions quant à leur place dans la systématique. Mais la comparaison entre les formes morphologiques des *Actinomycetes* dans des cultures pures et les formes qu'on trouve dans la plante (Schaede 1948, Hawker et Fraymouth 1951) permet d'établir quelques analogies. On constate dans les deux cas le stade initial de filaments et ensuite leur segmentation et la formation de formes granuleuses et bacillaires. Le stade de vésicules est caractéristique pour l'évolution des *Actinomycetes* dans les cellules de la plante-hôte, de même que la formation de bactéroïdes par les *Rhizobium*. Cependant, dans des cultures pures on note aussi la formation de renflements des hyphes, ce qui indique la capacité des *Actinomycetes* symbiotiques de produire de telles formes.

Les premiers travaux concernant la morphologie des *Actinomycetes* symbiotiques dans des cultures pures sont ceux de Peklo, mais leurs résultats — peut-être à cause d'assez primitives méthodes d'observation — sont difficiles à interpréter. Il a défini les microorganismes symbiotiques de l'aulne comme *Actinomyces alni*. Ensuite les plus vastes recherches étaient faites par v. Plotho. Elle a constaté que les souches symbiotiques des *Alnus* formaient des conidies ovales, produites à la suite de la segmentation d'hyphes. Etant donné ce caractère elles devraient être classées parmi les *Streptomyces*.

La classification des *Actinomycetes* symbiotiques des *Hippophae* rencontre quelques difficultés. Krasilnikow (1949) les classe parmi les *Proactinomyces*. Ils sont omis dans le manuel de Bergey (1957). La description morphologique des souches des organismes symbiotiques des *Hippohae* est en général le plus d'accord avec la description des *Nocardia* d'après Bergey. La différence consiste en ce que le mycélium des *Actinomycetes* symbiotiques se segmente en produisant, non des formes baccilaires, mais de fines granules donnant ensuite naissance aux formes bacillaires. Les renflements des hyphes et les formes d'involution sont aussi observés chez les *Nocardia*. Le caractère des colonies des *Actinomycetes* symbiotiques est en quelque sorte intermédiaire entre les caractères des colonies des *Streptomyces* et des *Nocardia*. Beaucoup d'espèces de *Nocardia* élaborent du pigment bleu, violet, rouge, jaune ou vert. Ce caractère est utilisé pour la classification des espèces. Les *Actinomycetes* symbiotiques des *Hippophae* élaborent un pigment jaune, rouge-orangé ou brun. Il y a aussi des souches incolores. L'élaboration du pigment est un caractère assez variable et dépendant des conditions de culture, c'est pourquoi il faut être très prudent à l'employer pour des buts taxonomiques.

À la suite des considérations, citées plus haut, les *Actinomycetes*

symbiotiques des *Hippophae* devraient être dénommés — *Nocardia hippophae*.

Les recherches concernant la physiologie des *Actinomycetes* symbiotiques des *Alnus* n'ont été faites que par Peklo et v. Plotho. Peklo a constaté une action stimulante des sels de potassium et des phosphates. V. Plotho, à la suite d'observations sur l'intensité de croissance et d'élaboration du pigment, a reconnu la dextrine et le glycérol comme la meilleure source de carbone. De mes expériences il résulte qu'il n'y a pas de stricte dépendance entre l'élaboration du pigment et la capacité d'utiliser une source donnée de carbone. On peut en général constater que les *Actinomycètes* symbiotiques ont la capacité d'utiliser de très diverses sources de carbone, ainsi que d'azote. Parmi les composés azotés seuls les nitrites et l'acétate d'ammonium étaient inutilisables. Dans ce dernier cas le manque de croissance est causé par l'action de l'acide acétique qui l'entrave.

La comparaison de la souche *4* avec des souches réisolées *4a* et *4b* montre une ressemblance entre les souches *4* et *4b*, pendant que la souche *4a* est différente non seulement par l'élaboration du pigment, mais aussi par quelques caractères physiologiques. On peut l'expliquer par le phénomène de la mutation qui s'opère au cours des changements auxquels les organismes symbiotiques sont soumis dans les cellules de la plante-hôte.

W a k s m a n — dans sa monographie sur les *Actinomycetes* (1950) — a exprimé l'avis qu'une place éminente est due aux *Actinomycetes* parmi les différents groupes de microorganismes qui sont facilement soumis à la variabilité et aux mutations. Ils sont facilement influencés par les conditions de culture et surtout par la composition du milieu. C'est pourquoi dans la classification on devrait plutôt parler des „groupes d'espèces" que d'espèces définies. Ce complexe de variabilité concerne d'après Waksman également l'aspect général des colonies et la formation du mycélium aérien, le genre de sporulation, l'élaboration du pigment et la vitalité de ces organismes sur divers milieux. Ainsi la comparaison entre la souche reisolée des nodules et celle employée pour l'inoculation peut parfois donner une fausse réponse.

BIBLIOGRAPHIE

B e r g e y, D. H., 1957: Manual of determinative bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore. 7th Ed.

B o n d, G., 1955: An isotopic study of the fixation of nitrogen associated with nodulated plants of *Alnus, Myrica, and Hippophae*. *J. Expt. Bot.*, **6** : 303.

B o n d, G., 1956: Evidence for fixation of nitrogen by root nodules of Alder (*Alnus*) under field conditions. *New Phytologist*, **55** : 147.

Bottomley, W. B., 1906: The cross inoculation of leguminosae and other root-nodule bearing plants. *Brit. Assoc. Adv. Sci., Rpt.*, **76** : 752.

Brunchorst, J., 1885: Über die Knöllchen an den Wurzeln von *Alnus* und den Elaeagenaceen. *Bot. Zentbl.*, **24** : 222.

Frank, B., 1895: Die Wurzelanschwellungen bildenden Erlen, Elaeagnaceen und Myricaceen. Die Krankheiten der Pflanzen **1** : 296.

Hawker, L. E., Fraymouth, J., 1951: A re-investigation of the root-nodules of species *Elaeagnus*, *Hippophae*, *Alnus* and *Myrica*, with special reference to the morphology and life histoires of the causative organisms. *J. Gen. Microbiol.*, **5** : 369.

Hiltner, L., 1896: Über die Bedeutung der Wurzelknöllchen von *Alnus glutinosa* für die Stickstoffernährung dieser Pflanze. *Landw. Vers. Sta.*, **46** : 153.

Käppel, M., Wartenberg, H., 1958: Der Formenwechsel des *Actinomyces alni* Peklo den Wurzeln von *Alnus glutinosa* Gaert. *Arch. Mikrobiol.* **30** : 46.

Krasilnikow, H. A., 1949: Opriedielitiel baktierij i aktinomicetow. Izd. Akademii Nauk SSSR, Moskwa.

Krebber, O., 1932: Untersuchungen über die Wurzelknöllchen der Erle. *Arch. Mikrobiol.*, **3** : 588.

Maire, R., Tison, A., 1909: La cytologie des *Plasmodiophoraceae* et la classe des *Phytomyzinae*. *Ann. Mycolog., Berl.*, **7** : 242.

Möller, H., 1885: *Plasmodiophora alni*. *Ber. Deut. Bot. Gesell.*, **3** : 102.

Niewiarowska, J., 1959: Symbioza u rokitnika. *Acta Microbiol. Polon.*, **8** : 289.

Peklo, J., 1910: Die pflanzlichen Aktinomykosen. *Zent. Bakter. II.*, **27** : 451.

Plotho v., O., 1940: Beiträge zur Kenntnis der Morphologie und Physiologie der Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.*, **11** : 33.

Plotho v., O., 1940: Die chromatische Substanz bei Actinomyceten. *Arch. Mikrobiol.*, **11** : 285.

Plotho v., O., 1941: Die Synthese der Knölichen an den Wurzeln der Erle. *Arch. Mikrobiol.*, **12** : 1.

Pommer, E. H., 1956: Beiträge zur Anatomie und Biologie der Wurzelknöllchen von *Alnus glutinosa* Gaertn. *Flora*, **143** : 603.

Quispel, A., 1954: Symbiotic nitrogen fixation in non-leguminous plants. *Acta bot. neerl.*, **3** : 495.

Roberg, M., 1934: Über den Erreger der Wurzelknöllchen von *Alnus* und den Elaeagnaceen *Elaeagnus* und *Hippophae*. *Jahrb. Wiss. Bot.*, **79** : 472.

Schaede, R., 1948: Die Pflanzlichen Symbiosen. Gustav Fischer, Jena.

Shibata, K., 1902: Cytologische Studien über die endotrophen Mykorrhizen. *Jahrb. Wiss. Bot.*, **37** : 643.

Spratt, E. R., 1912: The morphology of the root tubercles of *Alnus* and *Elaeagnus*, and the polymorphism of the organism causing their formation. *Ann. Botan.*, **26** : 119.

Taubert, H., 1956: Über den Infektionsforgang und die Entwicklung der Knöllchen bei *Alnus glutinosa* Gaertn. *Planta*, **48** : 135.

Waksman, S. A., 1950: The Actinomycetes. Chronica Botanica Comp. Waltham.

Warming, E., 1876: Wurzelknöllchen bei den Elaeagnen. Bot. Tidsskr. **1** : 84.

Woronin, M., 1866: Über die bei der Schwarzerle (*Alnus glutinosa*) und der gewöhnlichen Gartenlupine (*Lupinus mutabilis*) auftretenden Wurzelanschwellungen. *Mém. Acad. Imp. Sci., St.-Petersbourg*, Sér. 7, **10** : 1.

Virtanen, A. I., Saastamoinen, S., 1936: Untersuchungen über die Stickstoffbindung bei der Erle. *Biochem. Ztschr.*, **284** : 72.

Janina Niewiarowska

MORFOLOGIA I FIZJOLOGIA PROMIENIOWCÓW SYMBIOTYCZNYCH *HIPPOPHAE*

Streszczenie

Opracowano metodę izolacji promieniowców symbiotycznych z brodawek *Hippophae*. Brodawki wyjaławiano w 1% roztworze bromu przez 10 minut. Jako najkorzystniejszą metodę szczepienia uznano rozgniatanie brodawek na szalce lub też szczepienie roztartym w moździerzu materiałem. Określono najkorzystniejszy skład pożywki do izolacji.

Scharakteryzowano morfologię wyizolowanych szczepów. Stwierdzono, że nici promieniowców gram-dodatnie, słabo rozgałęzione, wykazujące nabrzmienia na przebiegu lub na końcach, rozpadają się na drobne ziarnistości, które przybierają większe rozmiary i po kilku dniach tworzą formy pałeczkowate. W starych kulturach, jak również na ubogich podłożach, wytwarzane są formy involucyjne, nieregularnie rozdęte. Młode kolonie są zbite, z biegiem czasu stają się miękkie lub kruche. Strzępki powietrzne są wytwarzane lub nie. Są szczepy bezbarwne lub też wytwarzające barwik żółty, pomarańczowoczerwony, albo brązowy. Na podstawie cech morfologicznych określono promieniowce symbiotyczne *Hippophae* jako *Nocardia hippophae*.

Określono niektóre cechy fizjologiczne promieniowców symbiotycznych. Stwierdzono, że wykazują one zdolność do wykorzystywania różnorodnych źródeł węgla i azotu. Otrzymano wzrost na wszystkich podanych cukrach. Spośród wyższych alkoholi nie wykorzystywany był jedynie sorbitol i dulcitol. Jako źródło azotu mogą służyć zarówno azotany i sole amonowe, jak i aminokwasy. Nie stwierdzono wzrostu jedynie na azotynach oraz na octanie amonu dzięki hamującemu działaniu kwasu octowego.

Optimum *pH* przypada około 7. Optimum temperatury leży między 22 a 27°. Stwierdzono, że spośród 2 szczepów reizolowanych z brodawki jeden był podobny do szczepu wyjściowego, natomiast drugi wykazywał pewne cechy odmienne.

Author's address:
Adres autora:
Mgr J. Niewiarowska,
Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego,
Warszawa, Nowy Świat 67,
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 287—306

Krystyna Danilewicz

BADANIA NAD ZDOLNOŚCIĄ NIEKTÓRYCH SZCZEPÓW *STREPTOMYCES* DO WYWOŁYWANIA PARCHA ZWYKŁEGO ZIEMNIAKA I BURAKA

Z Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego
Wpłynęło dnia 10 marca 1961 r.

Streszczenie

Z parchowych nekroz ziemniaków wyodrębniono 16 szczepów *Streptomyces*. Nie stwierdzono korelacji między badanymi cechami fizjologicznymi promieniowców a ich patogenicznością. Wykazano, że parcha zwykłego ziemniaka i buraka wywołuje prawdopodobnie nie tylko *Streptomyces scabies*, ale i inne szczepy *Streptomyces*. Potwierdzono pogląd Hoffmanna, że choroba pierścieniowa buraka wywołana jest przez *Streptomyces scabies*.

WSTĘP

Promieniowiec parchotwórczy został opisany po raz pierwszy przez Thaxtera (1891) pod nazwą *Oospora scabies*. Nazwa ta została później zmieniona na *Actinomyces scabies* (Thaxter) — przez Güssowa (1914, wg Waksmana, 1950) i następnie na *Streptomyces scabies* (Thaxter) Waksman i Henrici — przez Waksmana i Henriciego (wg. Bergeya).

W okresie kilkudziesięciu lat badań nad parchem wielokrotnie zmieniały się poglądy na zagadnienie, czy przyczyną parcha zwykłego jest jeden czy wiele gatunków bądź szczepów promieniowców. Thaxter uważał, że parcha zwykłego ziemniaka wywołuje tylko jeden gatunek promieniowca. Z poglądem tym nie zgadzali się Wollenweber (1920), Millard i Burr (1926) oraz Afanasiew (1937). Autorzy ci, reprezentując pogląd, że parcha zwykłego może wywoływać wiele gatunków promieniowców, nie byli jednak zgodni w opisach szczegółowych cech promieniowców parchotwórczych. Schaal (1944, wg Thomasa, 1947)

oraz Hooker (1949) przychylają się raczej do poglądu Thaxtera, ale w obrębie gatunku parchotwórczego promieniowca wyróżniają rasy fizjologiczne mniej lub więcej patogeniczne.

Hoffmann (1954b) stwierdził na terenie Niemiec występowanie tylko jednego gatunku parchotwórczego — *Str. scabies*, zastrzegając, że w procesie chorobowym nie jest wykluczony współudział innych promieniowców. Schaal i Direl (1959) prowadzący badania w Stanach Zjednoczonych izolowali przy pomocy mikromanipulatora z nekroz parchowych ziemniaków tylko *Str. scabies*. Autorzy ci jednak nie piszą, czy gatunek chorobotwórczy obejmował różne pod względem własności fizjologicznych szczepy (rasy, odmiany).

Jak widać z wyżej przytoczonej literatury, do dnia dzisiejszego spotyka się różnice w poglądach na sprawcę parcha zwykłego. Rozbieżności te sięgają jeszcze głębiej. W licznych pracach, wyróżnia się na podstawie zewnętrznych objawów chorobowych parcha płaskiego, wypukłego i wklęsłego. Schaal (1943, wg Waksmana, 1950) twierdzi, że charakter zmian chorobowych związany jest z występowaniem określonych cech u promieniowców należących do jednego gatunku. Wollenweber (1920), a także Millard i Burr (1926), wyrażają pogląd, że różne typy zachorzeń parchowych powodowane są przez różne gatunki promieniowców. Wypowiadane są wreszcie poglądy, że czynnikiem powodującym określonego typu zmiany chorobowe jest wrażliwość porażonej odmiany ziemniaków (De Bruyn 1935, wg Hoffmanna, 1954), lub warunki zewnętrzne: Afanasiew (1937), Gäumann i Häftlinger (1949).

W szeregu prac nad *Str. scabies* starano się znaleźć współzależność pomiędzy własnościami fizjologicznymi niektórych szczepów a stopniem ich zjadliwości. Należy tu wymienić przede wszystkim badania nad zdolnością do wykorzystywania niektórych cukrów przez szczepy chorobotwórcze (Afanasiew, 1937) oraz zdolnością do wytwarzania tyrozynazy (Gregory i Vaisey, 1956). Taylor i Decker (1947) zwrócili uwagę na fakt, że promieniowce parchotwórcze hodowane na mleku wytwarzają charakterystyczny ciemnobrązowy pierścień. Obserwację tę potwierdził Henrici (1930, wg Gregory i Vaisey, 1956). Jednakże praca Gregory i Vaiseya nie potwierdziła współzależności pomiędzy wytwarzaniem tyrozynazy i patogenicznością szczepów *Str. scabies*. Badacze ci pod wpływem naświetlania promieniami X uzyskali szczep *Str. scabies* nie wytwarzający tyrozynazy, a mimo to parchotwórczy. Wpływem warunków środowiska na rozwój parcha zajmowali się Gäumann i Häftlinger (1950) oraz Hoffmann i Schrödter (1954).

W pracy niniejszej zbadano niektóre własności fizjologiczne promie-

niowców parchotwórczych. Podjęto próbę ustalenia współzależności między niektórymi z tych cech i zjadliwością posiadających je szczepów. Przeprowadzono również szereg badań diagnostycznych zmierzających do ustalenia przynależności systematycznej patogenicznych szczepów.

BADANIA WŁASNE

WYODRĘBNIANIE SZCZEPÓW

Promieniowce izolowano z typowych zmian parchowych płaskich, wklęsłych i wypukłych ziemniaków odmian: *Kathadin*, *Epoka*, *Delta*, *Bintje*, udostępnionych przez IHAR (stacja doświadczalna Zamarte).

Bulwę starannie myto w wodzie bieżącej, płukano wodą destylowaną i suszono na powietrzu. Jałowym skalpelem wycinano fragmenty nekrotyczne, łącznie z tkanką skorkowaciałą i miąższem tkanki żywej. Skrawki rozcierano w moździerzu, miazgę przenoszono do kolbek z wodą jałową i w celu otrzymania równomiernej zawiesiny rano oczkiem i przenoszono do płytek Petriego, zalewając następnie pożywką Lindenbeina (1952) ostudzoną do temperatury 40-50°. Płytki inkubowano w temperaturze 27° przez 10 dni. Na płytkach rozwijały się niemal wyłącznie kolonie promieniowców i nieliczne kolonie bakterii. Rozwijające się na płytkach promieniowce przesiewano na skosy agarowe z pożywką syntetyczną (glicerol — 3%, lub glikoza — 1%, $NaNO_3$ — 0,2%, $MgSO_4 \cdot 7aq$ — 0,05%, KCl — 0,05%, $FeSO_4 \cdot 7aq$ — 0,001%, agar — 1,5%, woda dest., *pH* 6,8). Wyodrębniano wszystkie promieniowce wyrosłe na szalkach, przeprowadzając wstępną selekcję, w wyniku której do dalszych badań pozostawiono jedynie różniące się pomiędzy sobą szczepy z rodzaju *Streptomyces*. Ogółem zatrzymano 15 szczepów promieniowców z rodzaju *Streptomyces* i 1 szczep (Nr XX), nad którym prowadzone są obecnie dalsze badania.

Cechy morfologiczne i podstawowe własności fizjologiczne badano na szczepach rosnących na podłożach płynnych i stałych. Zdolność do wytwarzania rozpuszczalnego barwnika określano na podstawie wzrostu na pożywce syntetycznej z wyciągiem ziemniaczanym, na ziemniaku, żelatynie i mleku. Zdolność do wytwarzania tyrozynazy badano na pożywkach: wg Afanasiewa (1937), Vaiseya i Gregory (1956), Menzies i Dale (1959). Określono również zdolności amylolityczne, proteolityczne, wytwarzanie reduktazy i katalazy oraz wykorzystywanie cukrów i alkoholi.

Do wszystkich szczepień testowych używano szczepów hodowanych na pożywce Lindenbeina i na pożywce syntetycznej.

CHARAKTERYSTYKA SZCZEPÓW

Tabela I ilustruje własności morfologiczne badanych szczepów na podłożu Lindenbeina. Wszystkie szczepy z wyjątkiem szczepu Nr *I* wytwarzały konidia po 5 dniach. Szczep Nr *I* konidiował na tym podłożu dopiero po 30 dniach. Natomiast nie wykazany w tej tabeli szczep Nr *XX* nie konidiuje nawet po 6 miesiącach na żadnym z podłoży używanych do badań zarówno morfologicznych, jak i fizjologicznych.

Tabela I

Morfologia i charakter wzrostu promieniowców izolowanych
Morphology and type of growth of streptomyces

Nr szczepu Strain No.	Barwa grzybni Pigment		Barwnik wydzielany do podłoża Pigment diffunding to the medium
	wegetatywnej vegetative mycelium	powietrznej aerial hyphae	
I	jasnobrązowa	białoszara	nie wydziela
II	kremowa	białokremowa	jasnokremowy
III	biała	białoszara	nie wydziela
IV	oliwkowa, czerniejąca po 30 dniach	białoszara	jasnokremowy
V	kremowa	białoszara	jasnokremowy
VI	brązowa	białożółta	brązowy
VII	czarnozielona	ciemnoszara	zielonoszary
VIII	jasnozielona	biała	zielonoszary
IX	żółta	ciemnoszara	żółty
X	brązowa	białokremowa	brązowy
XI	bezbarwna	biała	nie wydziela
XII	niebieska, czerwieniejąca	niebieska czerwieniejąca	niebieski, czerwieniejący
XIII	zielonobrązowa	białoszara	brązowozielony
XIV	brązowooliwkowa	biała, po 30 dniach oliwkowa	jasnokremowy
XV	biała	ciemnoszara	nie wydziela

Zdolność *Streptomyces* do wywoływania parcha zwykłego

z nekroz parchowych. Podłoże Lindenbeina. Temperatura hodowli 27°
isolated from potato scab. Lindenbein's medium. 27°C

Wzrost Type of growth	Typ konidioforów * Type of conidiophores
grzybnia wegetatywna częściowo wrasta w podłoże, powierzchnia znacznie wypukła, gruzełkowata	prosty, rozgałęziony
wrasta w podłoże, powierzchnia płaska, aksamitna	spirale otwarte, pojedyncze
nie wrasta w podłoże, powierzchnia wypukła, pofałdowana	prosty, nierozgałęziony
nie wrasta w podłoże, powierzchnia wypukła, pofałdowana	spirale otwarte, pojedyncze
wrasta w podłoże, powierzchnia płaska, pofałdowana	prosty nierozgałęziony
nie wrasta w podłoże, powierzchnia wypukła, pofałdowana, gruboziarnista	prosty, rozgałęziony
wrasta w podłoże, powierzchnia płaska z drobnymi kraterami.	spirale otwarte, kilka w rozetce
nie wrasta w podłoże, powierzchnia wypukła, silnie pofałdowana	spirale otwarte, pojedyncze, z długą częścią główną
wrasta w podłoże, powierzchnia płaska z drobnymi kraterami	prosty, rozgałęziony w wiązce z krótką częścią główną
wrasta w podłoże, powierzchnia wypukla, pofałdowana, gruboziarnista	prosty, nierozgałęziony
wrasta w podłoże, powierzchnia wypukła, drobnoziarnista	spirale otwarte, pojedyncze
wrasta w podłoże, powierzchnia wypukła, drobnoziarnista	prosty, nierozgałęziony
wrasta w podłoże, powierzchnia lekko wypukła, pofałdowana z drobnymi kraterami	prosty, rozgałęziony
wrasta w podłoże, powierzchnia wypukła, drobnoziarnista	prosty, nierozgałęziony
wrasta w podłoże, powierzchnia płaska, drobnoziarnista	spirale otwarte, pojedyncze, z krótką częścią główną

* typ konidioforów obserwowano w kropli wiszącej na wyciągu ziemniaczanym.

W celu sprawdzenia wielokrotnie powtarzanej hipotezy o współzależności między wytwarzaniem tyrozynazy przez szczepy parchotwórcze i ich zjadliwością czy nawet zdolnością do wywoływania parcha, wysiewano badane szczepy na odpowiednie podłoża testowe. Wyniki przedstawia tabela II. Zdają się one wskazywać, że zdolność do produkowania barwnika (związanego z działalnością fenolaz jedno- i wielowodorotlenowych) zależy raczej od składu podłoża i trudno ją wiązać z własnościami chorobotwórczymi.

Tabela II

Wytwarzanie barwnika przez izolowane promieniowce. Temperatura hodowli 27°. Wynik obserwacji po 6 dniach
Pigment production by isolated streptomyces. Incubation: 27°C, 6-days

Nr szczepu Strain No	Podłoża medium				
	tyrozynowe tyrosine-medium		mleko milk	ziemniak potato	żelatyna gelatine
	1*	2*			
I	—	—	brązowy	brązowy	brązowy
II	—	—	—	—	—
III	brązowy	czarny	brązowy	czarny	brązowy
IV	—	czarny	—	—	—
V	brązowy	czarny	—	—	—
VI	—	czarny	—	czarny	brązowy
VII	czarny	czarny	—	—	—
VIII	czarny	czarny	—	—	—
IX	brązowy	czarny	—	brązowy	brązowy
X	—	czarny	brązowy	brązowy	brązowy
XI	—	—	—	—	—
XII	—	—	—	—	—
XIII	czarny	czarny	—	—	—
XIV	czarny	czarny	—	brązowy	brązowy
XV	—	—	—	—	—

1* podłoże tyrozynowe wg Vaiseya i Gregory (1956)
2* podłoże tyrozynowe wg Menzies i Dale (1959)
Wyjaśnienie: szczep Nr *XII* wytwarza na ziemniaku niebieski barwnik; po zakwaszeniu podłoża barwnik czerwienieje.

Charakterystyka niektórych własności biochemicznych przedstawiona jest w tabeli III. Niektórzy autorzy (Waksman, 1950), wiążą takie cechy, jak zdolność do hydrolizy skrobi, powolnego rozrzedzania żelatyny, redukcji azotanów z parchotwórczością promieniowców. Stwierdzono, że 5 szczepów (Nr *I*, *VIII*, *X*, *XIV*, *XV*) daje reakcję pozytywną na wszystkich podłożach po 2 tygodniach. Szczep Nr *III* dał również reakcję pozytywną na wszystkich podłożach, ale po dłuższej hodowli; żelatynę upłynniał bardzo wolno. Ze względu na tę ostatnią cechę jest on najbardziej

zbliżony do opisywanego w literaturze szczepu *Str. scabies* (Thaxter) (Waksman i Henrici).

Tabela III

Własności biochemiczne izolowanych promieniowców. Temperatura hodowli 27°. Wyniki odczytywano po 2 tygodniach

Biochemical characteristics of isolated streptomycetes. Incubation: 27°C, 2 weeks

Nr szczepu Strain No	Hydroliza skrobi Starch hydrolysis	Redukcja azotanów Nitrate reduction	Produkcja katalazy Catalase production	Upłynnianie żelatyny Gelatine liquefation
I	+	+	+	+
II	+	−	+	−
III	+	+	+	−
IV	+	−	+	+
V	+	−	+	+
VI	+	−	+	+
VII	+	+	+	−
VIII	+	+	+	+
IX	+	−	+	−
X	+	+	+	+
XI	+	−	+	+
XII	+	+	+	−
XIII	+	−	+	+
XIV	+	+	+	+
XV	+	+	+	+

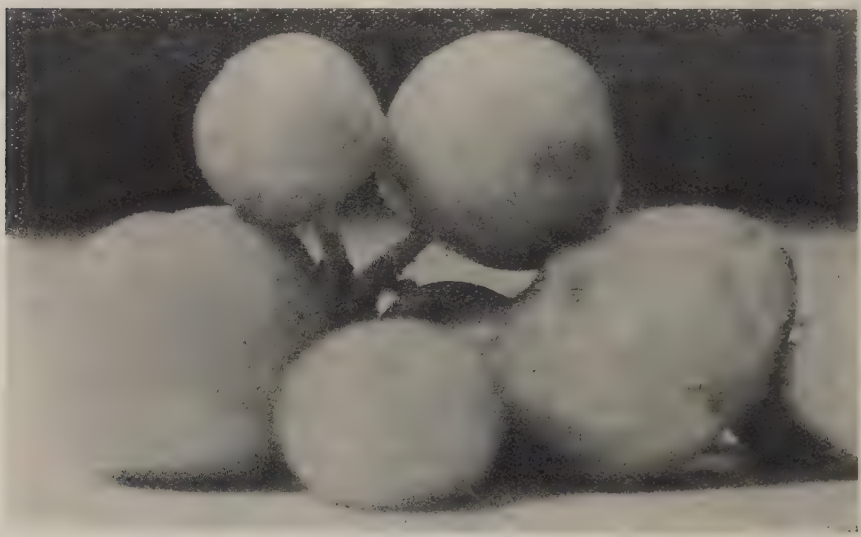
Tabela IV

Wzrost na cukrach i alkoholach. Temperatura hodowli 27°C. Wyniki odczytywano po 2 tygodniach

Utilization of sugars and alcohols. Incubation: 27°C, 2 weeks

Nr szczepu Strain No	*I*	*II*	*III*	*IV*	*V*	*VI*	*VII*	*VIII*	*IX*	*X*	*XI*	*XII*	*XIII*	*XIV*	*XV*
Glikoza	+		+					+	+			+			
Ksyloza		+	+					+	+			+	+		
Rafinoza	+	+	+					+	+				+		
Fruktoza		+	+	+				+	+					+	+
Ramnoza	+		+	+				+	+					+	
Maltoza	+		+					+							
Mannoza	+		+					+							
Arabinoza	+		+												
Sacharoza	+						+	+							
Laktoza	+		+			+	+	+				+			
Skrobia	+		+	+		+						+	+	+	
Glicerol	+		+			+		+				+	+	+	+
Mannitol	+		+			+		+				+	+	+	

Wyniki obserwacji wzrostu 15 szczepów promieniowców na cukrach i alkoholach (tabela IV) wykazują znaczne różnice między poszczególnymi szczepami. Ze względu na hipotezę Afanasiewa (1937), zgodnie z którą sacharozę i rafinozę zużywają tylko patogeniczne szczepy *Streptomyces*, specjalną uwagę zwrócono na wzrost badanych promieniowców na tych dwóch cukrach. Stwierdzono, że 9 szczepów rośnie dobrze na pożywce z sacharozą i rafinozą.



Fot. 1

Fot. 1. Ziemniaki zdrowe odmiany *Kathadin*. Kontrola (1959)
Phot. 1. Healthy potato tubers, variety *Kathadin*

BADANIA PATOGENICZNOŚCI PROMIENIOWCÓW

Zdolności wyosobnionych szczepów do wywoływania parcha sprawdzono testem sojowym Hoffmanna, testem Lawrance'a i w doświadczeniach wazonowych.

Test sojowy Hoffmanna (1954 a i b) zastosowano w dwu modyfikacjach. Nasiona soi wyjałowione powierzchniowo przez zanurzenie w 0,1-procentowym roztworze sublimatu na 15 minut i dokładnie opłukane wodą jałową kiełkowano na bibule filtracyjnej w szalkach Petriego; kiełki zakażano, wnosząc oczkiem dużą ilość konidii. Po trzech dniach hodowli w temperaturze pokojowej sprawdzano, czy kiełki zostały porażone. W drugiej modyfikacji po skiełkowaniu nasion i sprawdzeniu ich jałowości, przenoszono je do kolbek zawierających wyciąg glebowy zestalony agarem 1,3-procentowym, zakażony uprzednio konidiami badanych promieniowców. Jeśli kiełki nie wykazywały zmian chorobowych, zakażano je dodatkowo,

wnosząc oczkiem dużą ilość konidii. Kultury trzymano na świetle w temperaturze pokojowej, dodając wodę na powierzchnię agaru w ilościach niezbędnych dla normalnego rozwoju roślinek. Kontrolę stanowiły nie zakażane kiełki soi hodowane w tych samych warunkach. Wyniki odczytano po 20 dniach. Zastosowano trzy równoległe powtórzenia dla każdej z modyfikacji testu.

Test Lawrence'a (1956) w zasadzie służy do oceny odporności odmian ziemniaków na parcha. Malenkie 6-tygodniowe bulwki wrażliwej odmiany *Kathadin*, odpornej *Ackersegen* i praktycznie odpornej *Epoka*, o średnicy 0,5-1,5 mm jałowiono powierzchniowo, zanurzając na 15 minut w 0,1-procentowym roztworze sublimatu, przemywano i układano w szalkach Petriego na jałowej bibule filtracyjnej — zgodnie ze wskazówką Lawrence'a — i przeprowadzano kontrolę jałowości. Po trzech dniach bulwki zakażano konidiami promieniowców w ilościach zbliżonych do stosowanych w teście Hoffmanna. Kontrolę stanowiły bulwki nie zakażane.

Fot. 2

Fot. 2. Ziemniaki odmiany *Kathadin*. Parch wklęsły poorany, wywołany przez szczep Nr *XI* (1959)

Phot. 2. Potato tubers, variety *Kathadin*, "deep" scab caused by strain No. *XI*

Doświadczenia wazonowe prowadzono w sposób następujący. W pierwszym roku (12 kwietnia do 21 października 1958 r.) stosowano ogrodnicze donice gliniane wysokości 30 cm wypełnione żyzną glebą ogrodową o pojemności wodnej 41%. Wazony z glebą jałowiono jednorazowo w autoklawie pod ciśnieniem 2 atm przez 1 godzinę. Zdrowe i nie uszkodzone kłęby ziemniaczane jałowiono powierzchniowo, jak w teście Lawrence'a, (jedynie przedłużając czas działania sublimatu do 1 godziny), wysadzano do wazonów i w wazonach zakażano przez polanie całej powierzchni bulwy, przykrytej luźno ziemią, zawiesiną konidii. Po wschodach utrzymywano wilgotność gleby około 60% przez podsiąkanie wodą wodociągową, przegotowaną. W okresie tworzenia się stolonów i bulw glebę spulchniano, lekko zgar-

niano i powtórnie zakażano młode bulwki; po zabiegu powierzchnię gleby zalewano wodą, aby gleba osiadła na odkrywanych bulwkach i stolonach. W tym doświadczeniu nie stosowano równoległych powtórzeń. Donice ustawiono w hali wegetacyjnej na wózkach; w dni bezdeszczowe wywożono je na otwartą przestrzeń (nasłonecznioną i przewiewną). Temperatura powietrza w tym okresie wahała się od 12 do 30°. W październiku, gdy likwidowano doświadczenie, temperatura wynosiła 5°.

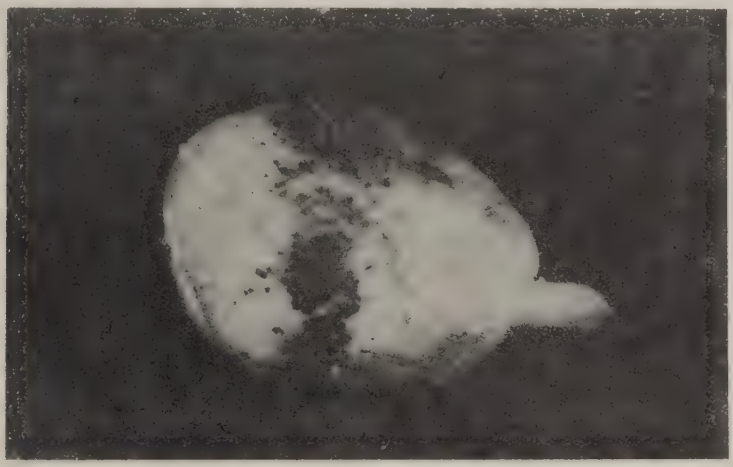
W drugim i trzecim roku doświadczeń wazonowych użyto nieco zmodyfikowanych donic Hoffmanna (K l i n k o w s k i i H o f f m a n n, 1952; H o f f m a n n 1954). Doświadczenia założono zgodnie ze wskazówkami Hoffmanna w następujący sposób: nie uszkodzone, wyjałowione kłęby ziemniaczane wysadzono do małych doniczek zawierających prażony, jałowy piasek. Kłęby umieszczono na głębokości około 10 cm. Hodowle prowadzono w komorze wegetacyjnej ciemnej (o temperaturze 15°), dbając o utrzymanie umiarkowanej wilgotności piasku. Po wyrośnięciu etiolowanego pędu (ok. 15 cm długości) przenoszono rośliny do doniczek Hoffmanna. Świeżo prażony, gorący piasek wysypywano do podstaw glinianych. Po ostygnięciu piasku wlewano jednorazowo pożywkę zawierającą: 4 g NH_4NO_3, 6 g K_2SO_4, 2,5 g $Ca(H_2PO_4)_2$, 2 g $MgSO_4 \cdot 7$ aq., 0,05 g cytrynianu żelaza i 5 ml roztworu mikroelementów (A - Z).

Piasek o 21% pojemności wodnej doprowadzono do 60% wilgotności. Bulwy, uprzednio skiełkowane, lekko wciskano w piasek, podstawę z piaskiem pokrywano donicą Hoffmanna odwróconą dnem do góry, etiolowany pęd przeciągano przez górny otwór doniczki, który następnie uszczelniano watą. Otwór w ściance doniczki zatykano korkiem gumowym. Otwór ten służy do doprowadzania wody w okresie wegetacyjnym, a także do zakażania w dowolnym okresie bez mechanicznego uszkodzenia stolonów i bulw, które tworzą się w powietrzu, a nie w piasku. Przestrzeń między podstawą i donicą uszczelniano watą. Donice ze wszystkich stron oblepiano mieszaniną gliny, ściółki torfowej i piasku w proporcji pozwalającej po wyschnięciu na utrzymywanie się skorupy na donicy bez większych spękań. Skorupę w okresie wegetacyjnym polewano wodą wodociągową niejałową; zabieg ten zabezpieczał przed nadmiernym parowaniem i nagrzewaniem się wnętrza donic. Dla utrzymania stałej wilgotności piasku wprowadzano raz w tygodniu, a gdy roślina całkowicie rozwinęła liście, 2 razy w tygodniu wodę świeżo destylowaną, przeprowadzając kontrolę wilgotności. Modyfikacja nasza w porównaniu z opisem Hoffmanna polegała na tym, że odwróconych dnem do góry donic nie wstawiano do podstawy, lecz ustawiano na krawędzi podstawy tak, aby brzegi donicy i podstawy stykały się. Woda, którą polewano pokrycie, ściekała poza podstawę. Zabezpieczało to hodowle przed nadmierną, szkodliwą wilgotnością i ułatwiało utrzymanie jałowości.

Infekcję stolonów i bulw w okresie wegetacyjnym 1959 r. przeprowadzono trzykrotnie: w czerwcu, lipcu i sierpniu. W 1960 r. zakażano ziemniaki jednorazowo w lipcu. Zakażano zawiesiną konidii w wodzie lub przez nałożenie oczkiem dużej ilości konidii wprost na bulwy. Doświadczenie prowadzono z ziemniakami odmian: *Kathadin, Ackersegen, Epoka, Wera.* Hodowle prowadzono w hali wegetacyjnej na wózkach, które wywożono w dni bezdeszczowe na otwartą przestrzeń (pod siatkę). W ostatnim roku doświadczeń wazonowych (1960) stosowano trzy równoległe powtórzenia dla każdego z badanych szczepów oraz 10 wazonów kontrolnych dla każdej z odmian.

Doświadczenie wazonowe prowadzono również z burakiem cukrowym. Nasiona buraków cukrowych odmiany *Udycz B*, jałowione powierzchniowo tak jak kłęby ziemniaczane, wysadzano do doniczek z jałowym piaskiem. Po rozwinięciu się

pierwszego liścia przenoszono roślinkę do wazonów 2-litrowych z pożywką płynną. W pożywce zanurzano jedynie koniec korzenia: po wytworzeniu korzeni bocznych i rozwinięciu dalszych liści jednomiesięczne rośliny zakażano konidiami promieniowców, lub jeżeli szczep nie wytwarzał konidii, roztartą grzybnią wegetatywną. Po wystąpieniu objawów choroby rośliny przenoszono do słojów 4-litrowych ze świeżą pożywką. Dla każdego z badanych promieniowców zastosowano 3 równoległe powtórzenia oraz 10 wazonów kontrolnych nie zakażanych.



Fot. 3

Fot. 3. Ziemniak odmiany *Wera*. Parch wypukły wywołany przez szczep Nr *VII* (1960)
Phot. 3. Potato tuber *Wera*, "convex" scab caused by strain No, *VII*

WYNIKI

Wynik testu sojowego (za wskaźnik dodatni przyjmuje się wyraźne porażenie kiełków) był częściowo negatywny: 10 szczepów powodowało wprawdzie ubytki tkanki w miejscu infekcji, ale soja rozwijała się nadal i po 20 dniach osiągnęła wysokość 60 cm. Żadnych zmian nie wywołały szczepy Nr *I*, *II*, *IV*, *V*, *X*. Test sojowy w szalkach Petriego wykazał podobne wyniki: kiełki brązowiały, ale roślina nadal się rozwijała. Przy porównaniu wyników uzyskanych w obu modyfikacjach testu nie stwierdzono zgodności wielokrotnie powtarzanych prób.

Wynik testu Lawrence'a był również ujemny: wprawdzie bulwki odmiany wrażliwej po zaszczepieniu konidiami promieniowców wykazały po 3 dniach wokół przetchlinek i szparek brązowe plamki, jednakże takie same plamki (po 9 dniach) pojawiły się na bulwkach odmiany odpornej i w kontroli. Kontrola mikrobiologiczna nie ujawniła obecności

drobnoustrojów w miejscach zmienionych. Należy sądzić, że ciemne plamki nie są wywołane przez patogeniczne szczepy promieniowców, lecz spowodowane zostały wpływem warunków przechowywania bulwek w czasie doświadczenia.

Wyniki doświadczeń wazonowych przedstawiają tabele V i VI. W okresie wegetacyjnym 1958 r. uzyskano wystąpienie bardzo słabych objawów parcha powierzchniowego, w formie złuszczenia naskórka (odpadający korek) w odmianie *Kathadin*. Zmiany te wywołało 5 szczepów Nr *I*, *V*, *VI*, *X*, *XI*. Szczepienie pozostałymi szczepami dało wynik negatywny. Odmiana praktycznie odporna *Epoka* i kontrola nie wykazały żadnych zmian chorobowych.

Tabela V

Występowanie parcha zwykłego różnych odmian ziemniaków pod wpływem zakażenia przez promieniowce (% porażonych bulw)
Scab infection in different potato varieties caused by examined streptomycetes strain (per cent of infected tubers)

Nr szczepu Strain No	Odmiany ziemniaka Varieties of potato			
	1958	1959	1960	
	Kathadin		*Wera*	*Epoka*
I	22,0	71,0	100	100
II	—	100	100	100
III	—	33,0	100	100
IV	—	100	100	100
V	58,0	25,0	100	100
VI	19,0	—	—	—
VII	—	100	100	100
VIII	—	100	100	100
IX	—	—	—	—
X	25,0	43,0	100	50,0
XI	22,0	45,0	100	75,0
XII	—	—	—	—
XIII	—	41,0	100	100
XIV	—	36,0	100	100
XV	—	25,0	100	100

W okresie wegetacyjnym 1959 r. odmianę *Kathadin* zakaziło 12 szczepów. Nie spowodowały choroby szczepy Nr *VI*, *IX*, *XII*. Nie stwierdzono żadnych zmian powierzchniowych w odmianie *Ackersegen* i w kontroli.

W okresie wegetacyjnym 1960 r. porażenie wystąpiło w odmianie *Epoka* i *Wera*. Parcha wywołało 12 szczepów (nie spowodowały zmian chorobowych szczepy Nr *VI*, *IX*, *XII*). Potwierdziło to wyniki uzyskane w ro-

ku poprzednim. Ponadto po raz pierwszy zakażano ziemniaki szczepem Nr *XX* izolowanym w 1960 r. z odmiany *Bintje*. Szczep ten wywołał parcha charakteryzującego się nadmiernym wytwarzaniem korka przez bulwy.

Pierwsze objawy zakażenia buraków cukrowych w kulturach wodnych ujawniły się po około 15 dniach w miejscu nałożenia konidii promieniowców, w formie lokalnych zmian powierzchniowych naskórka. Po dwu miesiącach schorzenie przybrało postać wgłębnych nekroz, typowych dla parcha zwykłego ziemniaka. Zasięg choroby objął powierzchnię korzenia w formie pierścienia, wzdłuż rysy itp. Porażenie wywołało 12 szczepów łącznie ze szczepem Nr *XX*. Nie wywołały choroby szczepy Nr *VI*, *VII*, *XII*, *XIV*.

Tabela VI

Typ parcha wywołanego przez promieniowce
Type of scab caused by examined streptomycetes strains

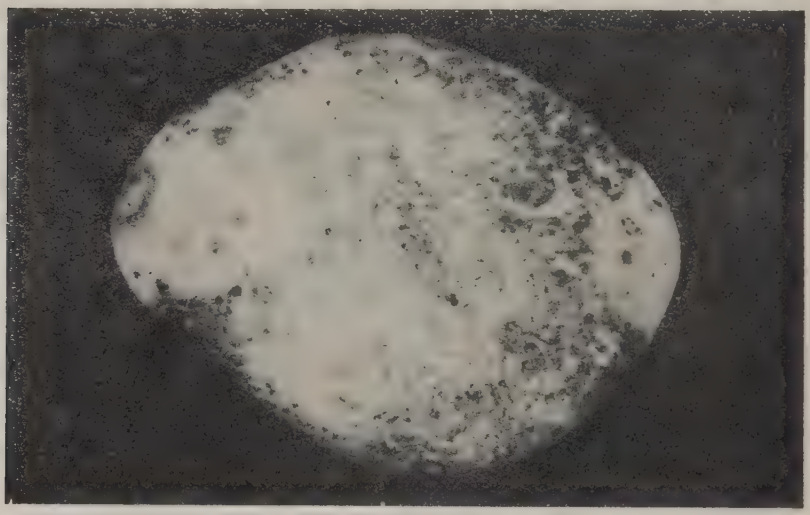
Nr szczepu Strain No.	Odmiany Varieties				
	1958 *Kathadin*	1959 *Kathadin*	*Wera*	1960 *Epoka*	*Buraki* Beet
I	P	P, G	P	P	P, G
II	—	W	G	P	P, G
III	—	G	G	G	P, G
IV	—	G	G	P	P, G
V	P	P	G	P	P, G
VI	P	—	—	—	—
VII	—	G	W	P	—
VIII	—	G	P	P	pierścień
IX	—	—	—	—	pierścień
X	P	P, G, W	G	P	G
XI	P	G, P	G	G	P, W
XII	—	—	—	—	—
XIII	—	G	G	G	W
XIV	—	G, P	W	plamki	W
XV	—	P	G	G	pierścień

Objaśnienia: P—powierzchniowy typ parcha zwykłego — surface scab
G—głęboki typ parcha zwykłego — "deep" scab
W—wypukły typ parcha zwykłego — "convex" scab

Tabela wykazuje jedynie przeważającą formę parcha; pod jednym krzakiem ziemniaka występowały wymienione trzy typy parcha na jednej bulwie lub na różnych bulwach. Wyniki odczytywano: u ziemniaka po 3 miesiącach, u buraka po 2 miesiącach.

DYSKUSJA

W literaturze opisywane są różne testy diagnostyczne, przy pomocy których można określić promieniowce patogeniczne. Testy te częściowo powtórzono i wykazano, że przy użyciu naszych szczepów żaden nie daje wyników w pełni jednoznacznych. Na przykład najsilniejsze własności parchotwórcze wykazywały szczepy *I*, *V*, *X* i *XI*. Szczep *V* i *X* nie wykorzystywał jednak sacharozy, mimo że ta własność, wg Afanasiewa (1937), związana jest z patogenicznością. Wytwarzanie barwnika brązowego, mającego być również jednym z wskaźników patogeniczności, okazało się zależne od warunków hodowli, a nie od charakteru szczepu.



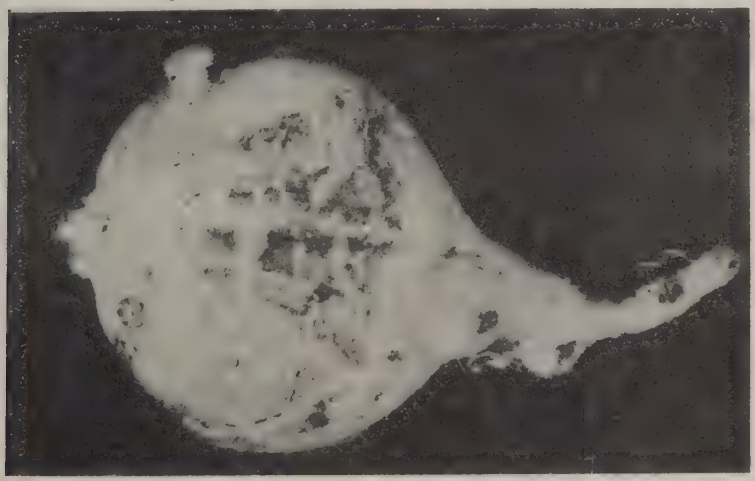
Fot. 4

Fot. 4. Ziemniak odmiany *Epoka*. Parch powierzchniowy wywołany przez szczep Nr *VII* (1960)
Phot. 4. Potato tuber, variety *Epoka*. "Surface" scab caused by strain No. *VII*

Wyniki uzyskiwane przy zastosowaniu obu modyfikacji testu sojowego nie były identyczne. Nie stwierdzono również równoległości wyników uzyskanych przy pomocy testu sojowego i przy zastosowaniu innych testów. Na podstawie naszych doświadczeń test ten można uznać za mało przydatny do określania patogeniczności szczepów. Zmiany występujące na zakażonych roślinach można przypisać zarówno wtórnym zakażeniom, jak i nieprzychylnym dla rozwoju roślin warunkom hodowli. Również i wartość testu Lawrance'a wydaje się wątpliwa. Wystą-

pienie brązowych plamek, stanowiących kryterium oceny, może być wywołane przez czynniki nie związane z porażeniem przez patogeniczne promieniowce.

Pamiętać należy, że wniknięcie promieniowca jest uzależnione od szeregu czynników. Znane są np. prace omawiające anatomię parcha zwykłego, w których stwierdzono, że promieniowiec wnika w okresie, kiedy przetchlinki pękają, i obnaża się tkanka niżej leżąca. Natomiast wnikanie przez szparki jest związane z fizjologią zamykania się i otwierania szparek; promieniowce parchotwórcze nie mają zdolności mechanicznego przebicia tkanki lub rozpuszczenia błon celulozowych i mogą wnikać jedynie przez otwarte szparki.



Fot. 5. Ziemniak odmiany *Wera*. Parch głęboki wywołany przez szczep Nr *XX* (1960)

Phot. 5. Potato tuber, variety *Wera*. "Convex" scab caused by strain No. *XX*

Wydaje się również, że należy podkreślić duży wpływ temperatury na skuteczność zakażenia. Ujawniło się to szczególnie w pierwszym i drugim okresie wegetacyjnym: w lipcu 1958 r., gdy temperatura dochodziła do 30°, dla wywołania schorzenia konieczne było aż trzykrotne zakażanie. Natomiast w trzecim okresie wegetacyjnym, gdy lato było chłodne (ok. 15-17°), parch wystąpił po jednorazowym zakażeniu.

Czytelniejsze wyniki uzyskano w doświadczeniach wazonowych: przejawy choroby były wyraźne. Poza parchem nie stwierdzono innych chorób roślin doświadczalnych. Ujawniły się różnice w stopniu zakażenia między odmianą praktycznie odporną *Epoka* a innymi odmianami wraż-

liwymi na parcha. Stwierdzono brak objawów choroby przy zakażaniu odmiany odpornej *Ackersegen.*

Wyróżniane umownie typy parcha wypukłego, wklęsłego lub płaskiego nie zależą — jak wynika z naszych obserwacji — od atakującego bulwę ziemniaczaną promieniowca, ale od stopnia zaawansowania choroby: w pierwszym okresie choroby zmiany wywołane przez promieniowce mają wygląd nie rozlewających się brązowych plamek wokół przetchlinek i szparek. Pod plamką wyróżnia się przejaśnienie tkanki. Plamki te łączą się i tworzy się korek (typ płaski). Korek zostaje uwypuklony przez głębsze jego warstwy (typ wypukły). W końcu korek pęka, odpada lub zapada się i powstają ubytki (typ wklęsły). Pod jednym krzakiem ziemniaka parch występował w formie powierzchniowej, wypukłej i głębokiej na różnych bulwach lub nawet na tej samej. Spostrzeżenie to dotyczy również porażenia parchem buraków cukrowych.

W pracy potwierdzono wniosek wysunięty przez Hoffmanna (1956), zgodnie z którym *Str. scabies* parchotwórczy dla ziemniaka atakuje również buraki cukrowe. Wniosek ten rozszerzono również na inne promieniowce zdolne do wywoływania parcha. Potwierdzono również, że tzw. choroba „pierścieniowa" buraków jest pochodzenia parchowego.

Wyizolowane i zbadane promieniowce różnią się od siebie cechami morfologicznymi i fizjologicznymi. Opierając się na opisach zawartych w kluczu Bergeya, Krasilnikowa i porównując je z danymi z oryginalnych prac systematyzujących promieniowce — Lindenbein (1952), Baldacci (1954), Zähner i Ettlinger (1957), Ettlinger, Corbaz i Hütter (1958), Frommer (1959) oraz z opisami gatunków promieniowców parchotwórczych Wollenwebera (1920) — szczepy nasze można uznać za zbliżone do uznanych za: — *Streptomyces scabies* (Thaxter) Waksmann i Henrici — szczep *III*, (szczepy *I, VI, X* są bardzo zbliżone do szczepu *III*, lecz różnią się szybkością rozrzedzania żelatyny, intensywnością i odcieniem wytwarzanego brązowego barwnika);

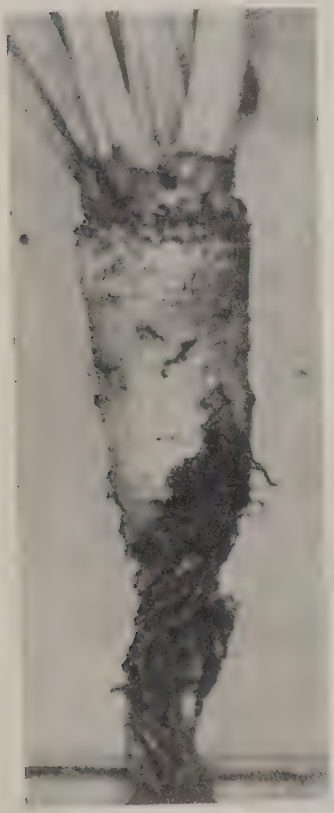
— *Streptomyces albus var. ochroleucus* — szczep *II*;
— *Streptomyces albus var. cretaceus* — szczep *IV*;
— *Streptomyces lavendulae* — szczep *VIII*;
— *Streptomyces flaveolus* — szczep *IX*;
— *Streptomyces coelicolor* — szczep *XII*;
— *Streptomyces intermedius* — szczep *XIII*.

Szczepy *V, VII, XI, XIV, XV* nie mają odpowiedników w opisach Bergeya, Krasilnikowa ani w pracach oryginalnych wyżej wymienionych autorów.

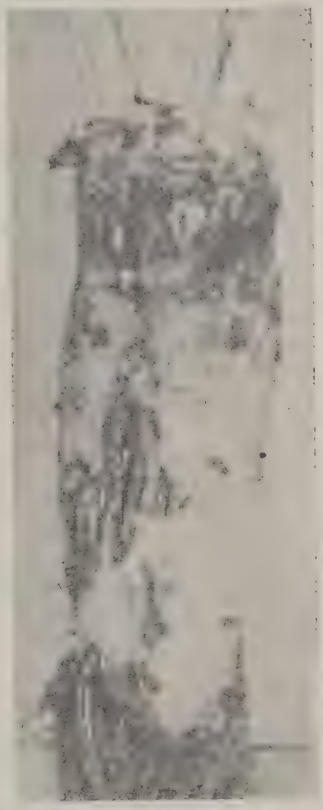
Wydaje się, że w świetle znanej zmienności promieniowców i trud-

ności taksonomicznych nie ma podstaw do definitywnego twierdzenia, że opracowane przez nas promieniowce stanowią odrębne gatunki.

Wollenweber (1920) uznawał *Str. coelicolor* za patogeniczny. Potwierdził to Millard i Burr (1926), a zaprzeczył temu Afanasiew (1937). W doświadczeniach naszych szczep *XII* — zbliżony do *Str. coelicolor* — okazał się saprofityczny. Szczep *IX* — zbliżony do *Str. flaveolus* — okazał się parchotwórczy tylko dla buraków cukrowych.



Fot. 6



Fot. 7

Fot. 6. Burak zdrowy odmiany *Udycz B.* Kontrola (1960)
Phot. 6. Healthy sugar beet, variety *Udycz B*

Fot. 7. Burak odmiany *Udycz B.* Parch wklęsły wywołany przez szczep Nr *XX* (1960)
Phot. 7. Sugar beet, variety *Udycz B*, "deep" scab caused by strain No. *XX*

Ze względu na nasilenie występowania parcha zwykłego i braku odpornych odmian ziemniaków (nieliczne są odporne lub praktycznie odporne) należałoby sądzić, że albo mamy do czynienia z niezwykłym rozpowszechnieniem w glebie różnych ras *Str. scabies*, albo też że inne gatunki promieniowców mogą być patogeniczne w odpowiednich warunkach środowiska. Pochodzenie parcha byłoby wielorakie.

Na podstawie badań własnych nad patogenicznością wyizolowanych przez nas niektórych szczepów promieniowców z rodzaju *Streptomyces* można wysnuć przypuszczenie, że nie tylko *Str. scabies*, ale również niektóre szczepy innych gatunków powszechnie występujących w glebie mogą w określonych warunkach wywoływać parcha zwykłego ziemniaka i buraka.

LITERATURA

Afanasiew, M. M., 1937: Comparative physiology of *Actinomyces* in relation to potato scab. *Nebraska agr. exp. sta. Res. Bull.*, **92**.

Baldacci, E., Spall, C., Grein, A., 1954: The classification of the *Actinomyces species* (= *Streptomyces*). *Arch. Mikrobiol.* **20** : 347.

Breed, R. S., Murray, E. G. D., Smith, N. R., 1957: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7-th Ed. London, Bailliere, Tindall and Cox.

De Bruyn, H. L. G., 1939: Ondorzoekingen over enkele actinomyceten welke a ardappelschurt verwekken. *Tijdschr. plantenziekten*, **45** : 135.

Ettlinger, L., Corbaz, R., Hütter, R., 1958: Zur Systematik der Actinomyceten. 4. Artenteilung der Gattung *Streptomyces* Waksman und Henrici. *Arch. Mikrobiol.*, **31** : 326.

Frommer, W., 1959: Zur Systematik der Actinomycin bildenden *Streptomyceten. Arch. Mikrobiol.*, **32** : 187.

Gäumann, E., 1946: Pflanzliche Infektionslehre. Verlag Birkhauser. Basel.

Gäumann, E., Häftlinger, E.: Der Einfluss der Bodentemperatur auf die Entwicklung und Schorfbefall der Kartoffelknolen. *Phytopath. Ztschr.*, **16** : 85.

Gregory, R. F., Vaisey, E. B., 1956: Pathogenicity of tyrosinaze deficient mutants of *Streptomyces scabies. Can. J. Mikrob.*, **2** : 000.

Henrici, A., 1930: Molds, yeast and actinomycetes. J. Wiley and Sons, N. York.

Hooker, W. J., 1949: Parasitic action of *Streptomyces scabies* on roots of seedlings. *Phytopathol.*, **39** : 442.

Hoffmann, G. M., 1954 a: Beiträge zur physiologischen Spezialisierung des Erregers des Kartoffelschorfes *Streptomyces scabies* (Thaxter) Waksman and Henrici. *Phytopath. Ztschr.*, **21** : 221.

Hoffmann, G. M., 1954 b: Die Schorfresistenzprüfung im Freiland, ihre Möglichkeiten und ihre Anwendung. *Der Züchter*, **24** : 11.

Hoffmann, G. M., Schrödter, A., 1954: Mikroklimatische Untersuchungen bei Kartoffelschorf Infectionen in Lochtöpfen unter Freilandbedingungen. *Der Züchter*, **24** : 131.

Klinkowsky, M., Hoffmann, G., 1952: Eine Methode zur Schorfresistenzprüfung der Kartoffel, *Der Züchter*, **22** : 92.

Krasilnikow, N. A., 1946: Opriedielitiel baktierii i aktinomicetow. AN SSSR Leningrad.

Lawrance, A. S., 1956: Infection by *Streptomyces scabies* and detache potato tubers. *Can. J. Microbiol.*, **2** : 757.
Lindenbein, W., 1952: Über einige chemisch interesante Actinomycetenstamme und ihre Klassifizierung. *Arch. Mikrobiol.*, **17** : 361.
Menzies, J. W., Dale, C. E., 1959: A selective indicator medium for isolating *Streptomyces scabies* from potato tuber or soil. *Phytopathol.*, **49** : 457.
Millard, I. A., Burr, S., 1926: A study of twenty-four strains of *Actinomyces* and their relation to types of common scab of potato. *Ann. appl. biol.*, **13** : 580.
Schaal, L. G., Direll, W., 1959: A simplified method of isolating single cells of *Streptomyces. Amer. Jour. pot.*, **36** : 137.
Thomas, W. D., 1947: Growth and variation of six physiologic races of *Actinomyces scabies* on different culture media. *Phytopathol.*, **37** : 319.
Taylor, C. F., Decker, Ph., 1947: A correlation between pathogenicity and cultural characteristics in the genus *Actinomyces. Phytopathol.*, **37** : 49.
Wollenweber, W., 1920: Der Kartoffelschorf. Arbeiten des Forschungs Institutes für Kartoffelbau. *Kartoffelbau*, **2** : 1.
Waksman, S. A.: 1950: The Actinomycetes. Waltham, Mass., USA.
Zähner, H., Ettlinger, L., 1957: Die Verwertung verschiedenen Kohlenstoffquellen als Hilfsmittel der Artbestimmung innerhalb der Gattung *Streptomyces. Arch. Mikrobiol.*, **26** : 307.

Krystyna Danilewicz

STUDIES ON THE ABILITY OF SOME *STREPTOMYCES* STRAINS TO CAUSE THE SCAB IN POTATO AND SUGAR-BEET

Summary

From the necrotized tissue of naturally infected potato tubers 16 strains of *Streptomycetes* were isolated. Their morphological and physiological characteristics are given in Tables I-IV. No correlation was found between physiological properties of examined strains and their infectivity and pathogenicity. The data on the pathogenicity of isolated strains are shown in Tables V and VI, and in Figs. 1-7. It was shown that the *Streptomyces scabies* is, probably, not a sole etiological agent of scab. Other strains seem to be able to cause the scab as well. Hoffmann's view was confirmed: the ring disease of sugar-beet may be caused by *Str. scabies.*

Adres autorki:
Author's address:
Mgr K. Danilewicz,
Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego,
Warszawa, Nowy Świat 67,
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 307—322

Leon Bożko, Krystyna Cypryk-Ossowska i *Bolesław Krzysztofik*

MIKROFLORA POWIETRZA ZAKŁADÓW GASTRONOMICZNYCH I POWIETRZA ATMOSFERYCZNEGO MIASTA WARSZAWY

Część I. Badania ilościowe

Z Zakładu Biologii Sanitarnej Politechniki Warszawskiej i z Instytutu Handlu Wewnętrznego w Warszawie

Wpłynęło dnia 21 kwietnia 1961 r.

Streszczenie

Stwierdzono duże wahania ilości mikroorganizmów w ciągu dnia. Ilości drobnoustrojów były na ogół mniejsze w porze zimowej, a większe w porze letniej. W okresie chłodniejszym ilość drobnoustrojów w lokalach była większa niż w powietrzu zewnętrznym, w miesiącach cieplejszych stosunki ilościowe były odwrotne.

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

METODY BADAŃ

Badania przeprowadzano w salach konsumpcyjnych 5 warszawskich zakładów gastronomicznych, 3 zakładowych magazynach i 2 kuchniach. Dla celów porównawczych przeprowadzono również badania w pomieszczeniach laboratoryjnych Politechniki Warszawskiej i Instytutu Handlu Wewnętrznego. Jednocześnie badano mikroflorę powietrza atmosferycznego w najbliższym sąsiedztwie badanych pomieszczeń.

Badania prowadzono dwiema metodami: jedną z metod aspiracyjnych — zderzeniową, przy zastosowaniu aparatu szczelinowego produkcji czeskiej firmy Chirana, i sedymentacyjną. Mikroflorę powietrza atmosferycznego badano tylko metodą sedymentacyjną. Przy użyciu aparatu szczelinowego przepuszczano 20 l powietrza w ciągu 1 minuty. Przy metodzie sedymentacyjnej płytki Petriego o średnicy 10 cm otwierano na 10 minut. Płytki inkubowano w 37° w ciągu 48 godzin. W każdej ze stosowanych metod eksponowano dwie równoległe płytki. Drobnoustroje hodowano na 2-procentowym agarze mięsno-peptonowym. Przy metodzie zderzeniowej ilość wyrosłych kolonii przeliczano na 1 m^3 powietrza. Przy metodzie sedymentacyjnej ilość wyrosłych kolonii przeliczano również na 1 m^3 powietrza stosując wzór Omeliańskiego (Miller, 1933, Gogoberidze, 1953, Jakubowska, 1954). Po-

wyższe przeliczenie umożliwiło zestawienie wyników uzyskanych obiema metodami i jednocześnie porównanie z wynikami z piśmiennictwa. Próby powietrza w pomieszczeniach pobierano na poziomie około 1 m od podłogi. Jednocześnie notowano stan pogody i oznaczano: temperaturę, ciśnienie atmosferyczne, wilgotność względną za pomocą psychrometru Assmana oraz zapylenie za pomocą konimetru firmy Zeiss model N 1. Jednocześnie dokładnie opisano badane pomieszczenia oraz notowano ilość przebywających osób i ich czynności.

Badania prowadzono od listopada 1955 r. do grudnia 1956 r. Wykonano łącznie 22 serie badań, obejmujące 520 prób. Próby były pobierane co godzinę, badania trwały na ogół od 7,30 do 20,30. W nocnym lokalu gastronomicznym badania prowadzono w ciągu nocy.

Badania porównawcze przeprowadzono w dwóch typach pomieszczeń:

1) W Laboratorium Zakładu Biologii Sanitarnej Politechniki Warszawskiej o powierzchni 22 m^2 i kubaturze 88 m^3.

2) W pokoju przygotowawczym Pracowni Technologicznej IHW o powierzchni 11,2 m^2 i kubaturze 36,9 m^3.

Wyniki pierwszego badania wykonanego w listopadzie 1955 r. w pokoju przygotowawczym IHW przedstawione są w tabeli i na wykresie 1. Stwierdzono, że próby pobrane metodą zderzeniową wykazały większe wahania ilości mikroorganizmów, niż ujawniono metodą sedymentacyjną, i większą przeciętną.

Drugie badanie (wykres 2) przeprowadzone w Laboratorium Politechniki Warszawskiej w czerwcu 1956 r. wykazało za pomocą metody sedymentacyjnej stosunkowo niskie ilości mikroorganizmów. Przy pomocy metody zderzeniowej wykryto jeszcze mniejsze i mało wahające się ilości. Ilość mikroorganizmów w powietrzu atmosferycznym była w tym czasie wyższa i wahała się w dużych granicach.

Na podstawie tych badań porównawczych można wyprowadzić następujące podstawowe wnioski:

1) Wyniki uzyskane przy zastosowaniu metody sedymentacyjnej i zderzeniowej różnią się od siebie. W pokoju przygotowawczym IHW mieszczącym się na V piętrze, gdzie intensywnie pracowano i gdzie zanieczyszczenie mikrobiologiczne było na ogół duże, wykryto za pomocą metody zderzeniowej większą przeciętną ilość mikroorganizmów niż za pomocą metody sedymentacyjnej. Natomiast w Laboratorium Politechniki Warszawskiej, mieszczącym się na I piętrze, gdzie przebywały tylko 1-2 osoby i gdzie zanieczyszczenie mikrobiologiczne było małe, wykryto metodą sedymentacyjną na ogół większą przeciętną ilość mikroorganizmów niż za pomocą metody zderzeniowej.

2) Ilość mikroorganizmów tak w powietrzu atmosferycznym, jak i w powietrzu pomieszczeń zamkniętych ulega w ciągu dnia dużym na ogół wahaniom, często krótkotrwałym. Z uwagi na stwierdzone szybko

zachodzące zmiany ilości mikroorganizmów w powietrzu, zależne od czynników zewnętrznych, dla dokładniejszego zobrazowania mikroflory powietrza próby jej powinny być pobierane często i z dokładnym scharakteryzowaniem otaczającego środowiska.

BADANIA MIKROFLORY POWIETRZA ATMOSFERYCZNEGO

Łącznie przeprowadzono 15 badań dziennych mikroflory powietrza atmosferycznego za pomocą metody sedymentacyjnej w okresie od 25. XI. 1955 r. do 23. VIII. 1956 r. Otrzymane wyniki wykazują duże wahania ilościowe mikroflory powietrza atmosferycznego. W ciągu dnia występują na ogół 2-4 zwyżki ilości drobnoustrojów w powietrzu obniżające się następnie niekiedy nawet już w ciągu 1-2 godzin.

W miesiącach chłodnych ilość drobnoustrojów w powietrzu atmosferycznym była o wiele niższa niż w miesiącach ciepłych. Wyraźnie dał się zauważyć wpływ opadów na zawartość mikroflory w powietrzu: np. 25. IV. 56, w dzień deszczowy, ilość mikroorganizmów w powietrzu atmosferycznym obniżyła się do 3460, wzrastając już w następny dzień pogodny do 20210.

BADANIA MIKROFLORY POWIETRZA W ZAKŁADACH GASTRONOMICZNYCH

Badania w salach konsumpcyjnych

Badania przeprowadzono w 5 lokalach oznaczonych jako: A, B, C, D, F. Lokale A, B, C, D, spełniające rolę stołówek, charakteryzowały się stosunkowo dużą przelotowością, przeciętnymi warunkami higieniczno-sanitarnymi i raczej nieprawidłowym układem funkcjonalnym. Lokal A o kubaturze 280 m^3 mieści się na parterze. W lokalu czynny jest często wentylator. Lokal B o kubaturze 297 m^3 mieści się na parterze. W sali konsumpcyjnej znajduje się szatnia. Stoliki są ustawione w stosunkowo niedużej od siebie odległości, co stwarza duże zagęszczenie. Lokal C o kubaturze 297 m^3 znajduje się na I piętrze. Urządzenia klimatyzacyjne rzadko czynne. Lokal D o kubaturze 168 m^3 znajduje się na parterze. Posiada jedno okno wychodzące na podwórze z czynnym wentylatorem. Jest to pomieszczenie przez które obsługa przenosi posiłki do przylegających pokoi.

Lokal F mieszczący się na poziomie pół-piwnicy jest lokalem tanecznym czynnym wieczorem. Ma on kształt okrągły o powierzchni około 700 m^2 i wysokości około 5 do 6 m. Ma dobrze funkcjonujące urządzenie klimatyzacyjne i czynną w określonych odstępach czasu fontannę, umieszczoną w środku lokalu. Lokal jest wyjątkowo dobrze utrzymany, sprzątanie odbywa się w godzinach rannych przy pomocy odkurzacza.

Wyniki badań mikroflory powietrza w lokalu A przedstawione są na wykresach 5, 10, 11 i w tabeli. W styczniu ilość mikroorganizmów wykrywanych za pomocą obydwóch metod była prawie wyrównana (100% — metoda zderzeniowa *, 89,2% — metoda sedymentacyjna).

* Przy dalszych porównaniach wskaźnik uzyskany metodą zderzeniową również przyjmowany jest za 100.

W maju i sierpniu wykrywano metodą sedymentacyjną znacznie większe ilości mikroorganizmów (w maju — 252,0%, w sierpniu 187,8%) niż za pomocą metody zderzeniowej. W tych miesiącach przeciętna ilość mikroorganizmów była w lokalu niższa, niż w powietrzu atmosferycznym. Ilości mikroorganizmów w ciągu dnia ulegały wahaniom; częstsze i krótkotrwałe wahania ujawniała metoda sedymentacyjna; wartości charakteryzujące ilości mikroorganizmów, wykrywanych metodą zderzeniową, były na ogół bardziej wyrównane. Ilość mikroorganizmów wykrywanych metodą sedymentacyjną powiększała się zawsze przy sprzątaniu i przy powiększaniu się ilości osób w lokalu. Ilość mikroorganizmów wykrywanych metodą zderzeniową powiększała się również w tych warunkach, o ile nie był czynny w tym czasie wentylator. W czasie działania wentylatora następowało nawet obniżenie się ilości mikroorganizmów, wykrywanych za pomocą metody zderzeniowej.

Wyniki analiz mikroflory powietrza w lokalu B przedstawione są na wykresach 7, 8 i w tabeli.

Pierwsze badanie przeprowadzono 16. IV. 56 przy pogodzie bezdeszczowej i przy dość dużej ilości mikroorganizmów w powietrzu atmosferycznym. W lokalu przebywała duża ilość osób (przeciętnie 35 osob; tak wysokiej przeciętnej nie spotykano podczas innych badań w dziennych lokalach). Zapylenie powietrza w lokalu było duże. W powietrzu lokalu wykryto bardzo dużą ilość mikroorganizmów — największą spośród stwierdzonych we wszystkich badaniach. Metodą sedymentacyjną wykrywano większą ilość mikroorganizmów (przeciętna 168,6%), niż metodą zderzeniową.

Drugie badanie przeprowadzono 25. IV. 56 przy pogodzie deszczowej i przy małej ilości mikroorganizmów w powietrzu atmosferycznym. Pomimo przebywania w lokalu dość dużej ilości osób (przeciętnie 29 osób) i bardzo dużego zapylenia (przeciętnie ilość pyłków $89{,}6 \cdot 10^6$ w 1 m^3 — największa spośród wszystkich prowadzonych badań) wykazano w powietrzu lokalu stosunkowo małą ilość mikroorganizmów. Metoda sedymentacyjna dała wyniki nieco wyższe (128,1%) niż zderzeniowa.

Badania ujawniły wyraźnie wpływ powietrza atmosferycznego na mikroflorę powietrza w lokalu. W obydwóch badaniach ilość mikroorganizmów w powietrzu lokalu wzrastała podczas sprzątania oraz przy wzroście ilości osób. Ilości mikroorganizmów, wykryte metodą sedymentacyjną oraz w pierwszym badaniu metodą zderzeniową wykazywały duże wahania. W drugim badaniu ilości mikroorganizmów wykryte metodą zderzeniową były bardziej wyrównane.

Badania mikroflory powietrza w lokalu C przeprowadzone dwa razy w grudniu 1955 i raz w maju 1956 wykazały stosunkowo bardzo małą zawartość mikroorganizmów (wykres 3, 4 i 9, tabela). W badaniu

z 8 grudnia przy bardzo małej liczbie osób w lokalu ilość mikroorganizmów wykryta metodą zderzeniową była większa, niż metodą sedymentacyjną (67,7%); w pozostałych dwóch badaniach ilości mikroorganizmów wykryte metodą sedymentacyjną były większe, niż metodą zderzeniową. W maju przeciętna ilość mikroorganizmów w powietrzu lokalu była niższa niż w powietrzu atmosferycznym. Znaczne zwyżki ilości mikroorganizmów w powietrzu występowały wyraźnie podczas sprzątania i przygotowywania lokalu do posiłków oraz podczas zwiększania się liczby osób w lokalu.

W lokalu D przeprowadzono jedno badanie dnia 17 stycznia 1956 (wykres 6, tabela). W powietrzu lokalu wykryto metodą sedymentacyjną ilości mikroorganizmów zbliżone do ilości w powietrzu atmosferycznym. Było to niewątpliwie związane z częstym działaniem w lokalu wentylatora i również częstym otwieraniem okna. Tym należy też tłumaczyć niepowiększanie się na ogół ilości mikroorganizmów w powietrzu w lokalu przy wzroście liczby osób.

Wyniki 2 badań przeprowadzonych w lokalu F w grudniu 1956 r. przedstawione są na wykresach 12, 13 i w tabeli. Ilość mikroorganizmów ujawnionych metodą sedymentacyjną była wyższa (15 grudzień — 275%, 16 grudzień — 243%) niż określona metodą zderzeniową. Duże wahania ilości mikroorganizmów nie były częste. Zwiększenie ilości mikroorganizmów w powietrzu następowało przede wszystkim przy powiększaniu się liczby osób w lokalu, szczególnie podczas tańców.

Badania w magazynach żywnościowych

Badania przeprowadzono w magazynach żywnościowych oznaczonych *a*, *c*, *e*. Magazyn *a* o kubaturze 14 m^3 znajduje się w piwnicy. W magazynie przechowywane jest przede wszystkim mięso (na lodzie). Powietrze w magazynie ma zapach przykry — cuchnący. Magazyn *c* o kubaturze 168 m^3 znajduje się w piwnicy. Posiada tylko jedno małe okienko wychodzące na korytarz. Magazyn *e* o kubaturze 36 m^3, znajdujący się na parterze, posiada jedno duże okno prawie zawsze otwarte, wychodzące na podwórko. W pokoju sąsiednim czynny jest wentylator. Powietrze w magazynie ma zapach nieprzyjemny — lekko stęchły.

Badania powietrza w magazynach przeprowadzono w czerwcu 1956 r. Wyniki przedstawione są na wykresach 14, 15, 16 i w tabeli.

W powietrzu magazynu *e* ilość mikroorganizmów była większa, niż w magazynie *c*, a znacznie mniejsza niż w powietrzu atmosferycznym. Metodą zderzeniową wykryto większą ilość mikroorganizmów niż metodą sedymentacyjną (81,4%). W powietrzu magazynu *a* ilość mikroorganizmów była największa, przy czym podobnie jak w magazynie *e* znacznie większą ilość stwierdzono metodą zderzeniową, niż metodą sedymentacyjną (69,1%). Ilości mikroorganizmów w powietrzu magazynów

wzrastały wyraźnie podczas porządkowania magazynów oraz podczas zwiększonego ruchu.

Badania w kuchniach

Metodą sedymentacyjną przeprowadzono w kwietniu jedno badanie mikroflory powietrza w kuchni w lokalu A i trzy w lokalu B. Wykonane jednocześnie porównawcze badania mikroflory powietrza w salach konsumpcyjnych i w kuchniach lokalu B wykazały, że zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza w kuchniach było mniejsze niż w salach konsumpcyjnych (p. tabela).

DYSKUSJA

Ilości mikroorganizmów w 1 m^3 powietrza atmosferycznego Warszawy ujawniane metodą sedymentacyjną wahały się od 220 do 91 210. Przeciętne dzienne wahały się od 1410 do 31 820.

Badanie mikroflory powietrza atmosferycznego w Warszawie przeprowadzone przez Bujwida (1894), głównie za pomocą rury Hessego, wykazało (po dokonaniu przez nas odpowiednich przeliczeń) wahania ilości mikroorganizmów w 1 m^3 powietrza od 1400 do 46 800. Ilości mikroorganizmów wykrytych przez nas inną metodą są więc zbliżone do dawniejszych wyników otrzymanych przez Bujwida.

Ścisłe porównanie naszych rezultatów z wynikami badań innych autorów nie zawsze jest możliwe z uwagi na stosowanie przez różnych autorów bardzo różnych metod zarówno pobierania prób, jak i wykonywania oznaczeń. Ze względów porównawczych zasługują przede wszystkim na uwagę wyniki badań mikroflory powietrza atmosferycznego Moskwy przeprowadzone jednocześnie trzema metodami: metodą sedymentacyjną oraz dwiema metodami aspiracyjnymi (jedna z użyciem filtrów membranowych i druga z zastosowaniem aparatu szczelinowego pomysłu Krotowa). Dianowa (1957) podaje, że na jednej z ulic Moskwy wykrywano w 1 m^3 powietrza metodą sedymentacyjną ilości bakterii wykazujące duże wahania od 1300 do 122 900 z maksimum w sierpniu — wrześniu. Za pomocą obydwóch metod aspiracyjnych wykrywano znacznie niższe ilości bakterii — od 600 do 7000. Bugrowa (1957) na podstawie 1500 badań podaje, że przeciętne ilości bakterii w 1 m^3 powietrza Moskwy wahały się w następujących granicach: oznaczone metodą sedymentacyjną od 800 (zima) do 10 000 (lato), — aparatem Krotowa od 240 (zima) do 1800 (lato), — za pomocą filtrów membranowych od 190 (zima) do 1500 (lato).

Z danych tych można wnioskować, że w badanych okresach ilości mikroorganizmów stwierdzone metodą sedymentacyjną w powietrzu War-

szawy były dość zbliżone do ilości mikroorganizmów w powietrzu Moskwy. Z danych tych wynika również, że ilości drobnoustrojów w powietrzu atmosferycznym wykazywane metodą sedymentacyjną i przeliczone następnie na zawartość w 1 m^3 są znacznie większe od ilości wykrywanych metodami aspiracyjnymi, np. za pomocą aparatu szczelinowego. Potwierdzają to również i inni badacze.

Turżecki i Oleniewa (1957), porównując wskazania metody sedymentacyjnej i aparatu Krotowa na podstawie 179 badań mikroflory powietrza atmosferycznego, stwierdzają, że metodą sedymentacyjną otrzymuje się ilości mikroorganizmów, po przeliczeniu na 1 m^3, większe niż przy użyciu aparatu Krotowa: często 3-6-krotnie, rzadziej 6-10-krotnie, a w pojedynczych wypadkach nawet 18-20-krotnie.

Sidorenko (1956) twierdzi, że przy dłużej trwających, systematycznych obserwacjach metoda sedymentacyjna wykazuje rzeczywistą ilość bakterii w powietrzu atmosferycznym. Dla pojedynczych jednak obserwacji metoda sedymentacyjna jest nieprzydatna, gdyż otrzymane rezultaty mogą mieć dużą amplitudę wahań i charakter przypadkowy. Niektórzy autorzy (Krotow 1953, Włodawiec 1957) są zdania, że metoda sedymentacyjna w ogóle nie jest przydatna dla ilościowego oznaczania mikroflory powietrza atmosferycznego, gdyż prądy powietrzne sztucznie powiększają ilość mikroorganizmów osadzających się na płytkach.

Jesteśmy zdania, podobnie jak Turżecki i Oleniewa (1957), że każde badanie powietrza atmosferycznego powinno być wykonywane jednocześnie za pomocą obydwóch metod, aspiracyjnej i sedymentacyjnej, i że metody te nie mogą zastępować jedna drugiej. Metoda aspiracyjna umożliwia bowiem pobieranie ilościowe przede wszystkim unoszących się w powietrzu mikroorganizmów, znajdujących się na lekkich cząsteczkach pyłowych. Metodą sedymentacyjną natomiast oznaczamy opadające mikroorganizmy związane przede wszystkim z większymi i cięższymi cząsteczkami pyłowymi.

Z uwagi na to, że metoda sedymentacyjna rejestruje tylko ilość mikroorganizmów opadających na pewną powierzchnię w określonym czasie, słuszny jest panujący na ogół obecnie pogląd, że wyników otrzymanych za pomocą tej metody nie należy przeliczać na 1 m^3 powietrza lecz na 1 m^2 powierzchni na 1 minutę opadania, lub nawet bezpośrednio podawać wyniki otrzymane na płytkach (określając wymiary płytek i trwanie ekspozycji) bez dokonywania dalszych przeliczeń. Ten pogląd wypowiadają m. in. Bourdillon (1948), Wells (1955), Dianowa (1957), Turżecki i Oleniewa (1957), Szafir (1959).

W naszych badaniach stwierdzano na ogół metodą sedymentacyjną większe wahania ilości mikroorganizmów w ciągu dnia, niż metodą zde-

rzeniową. Przeciętne dzienne ilości mikroorganizmów stwierdzone metodą sedymentacyjną wynosiły 67,7 - 275,0% ilości mikroorganizmów wykrywanych metodą zderzeniową. W okresie chłodniejszym w dziennych lokalach gastronomicznych i w pokoju przygotowawczym IHW, a w okresie cieplejszym w magazynach metodą sedymentacyjną wykrywano ilości mikroorganizmów mniejsze lub zbliżone do ilości mikroorganizmów ujawnionych metodą zderzeniową (67,7 - 109,5%). W okresie cieplejszym w dziennych lokalach gastronomicznych oraz w laboratorium Politechniki Warszawskiej ilość mikroorganizmów wykrywana metodą sedymentacyjną była większa (128,1 - 252,0%) niż metodą zderzeniową, przy czym stosunek ten w dnie deszczowe był na ogół bardziej wyrównany niż w dnie bezdeszczowe lub o opadach małych. W lokalu tanecznym w próbach pobranych w zimie ilości mikroorganizmów, wykrywanych metodą sedymentacyjną, były znacznie większe (275,0 i 242,7%) niż metodą zderzeniową.

Z piśmiennictwa znane są nam tylko nieliczne badania mikroflory powietrza w zakładach gastronomicznych. Szafir (1945) za pomocą wirówki własnego pomysłu znalazł w grudniu 1940 r. w 1 m^3 powietrza w sali konsumpcyjnej lokalu gastronomicznego 10 424 mikroorganizmów, a w kuchni — 8380. Zacharow i inni (1954) znajdowali w sali konsumpcyjnej za pomocą metody sedymentacyjnej w okresie od listopada 1951 do sierpnia 1952 ilości mikroorganizmów wahające się od 955 do 15 919.

Stwierdzone przez nas ilości mikroorganizmów w powietrzu warszawskich zakładów gastronomicznych są zbliżone do wyżej przytoczonych danych z piśmiennictwa.

Wielu badaczy zajmowało się porównaniem uzyskanych w pomieszczeniach zamkniętych wskazań metody sedymentacyjnej (w przeliczeniu

Rys. 1-16. Zmiany ilości mikroflory powietrza pomieszczeń w powiązaniu z jego zapyleniem, wilgotnością względną, ilością obecnych osób oraz mikroflorą powietrza atmosferycznego w Warszawie

Fig. 1-16. Variations in the microflore content of the indoor air, dust particles contetn, relative humidity, number of persons and microflore content of outdoor air in Warszawa

POWIETRZE POMIESZCZEŃ — INDOOR AIR

------ Ilość mikroorganizmów — metoda zderzeniowa
microbic counts obtained by slit sampler

—..— ilość mikroorganizmów — metoda sedymentacyjna
microbic counts obtained by open plate

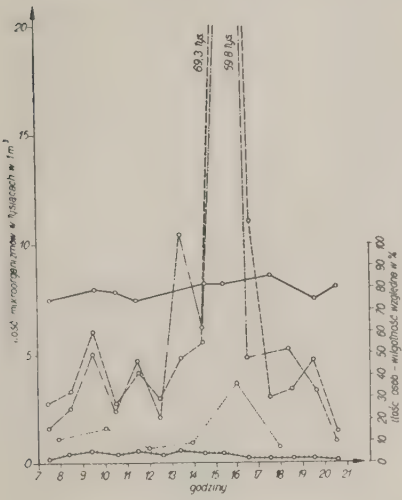
++++ ilość osób
no. of persons

———— wilgotność względna w %
relative humidity (per cent)

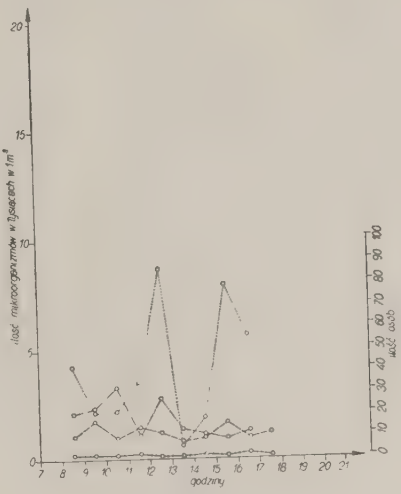
—.— ilość pyłków w milionach w 1 m^3
dust particles per cu. m. in millions

POWIETRZE ATMOSFERYCZNE — OUTDOOR AIR

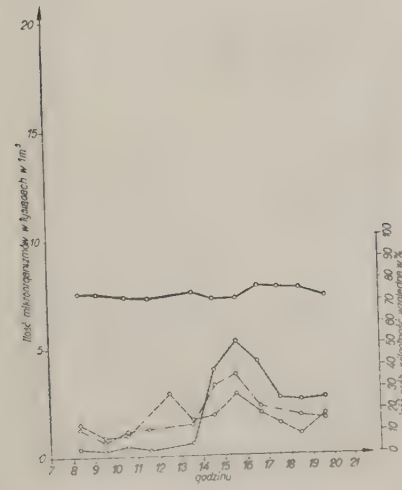
..... ilość mikroorganizmów — metoda sedymentacyjna
microbic counts obtained by open plate.



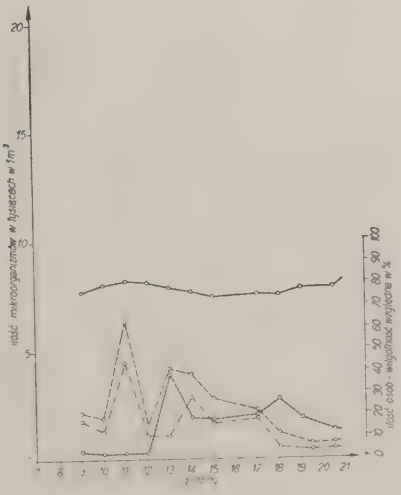
Wykres 1



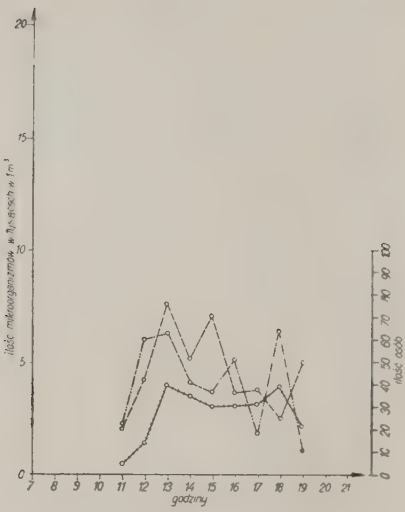
Wykres 2



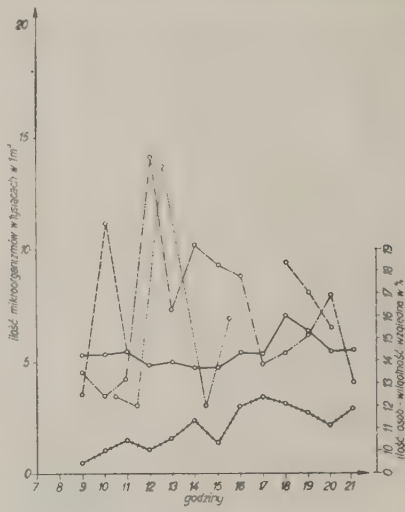
Wykres 3



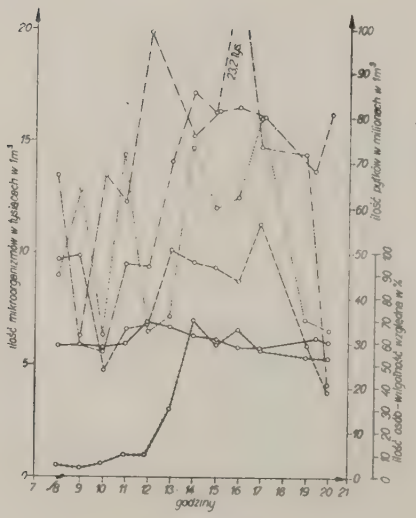
Wykres 4



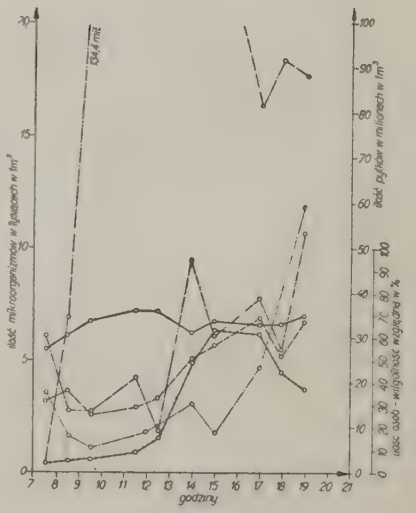
Wykres 5



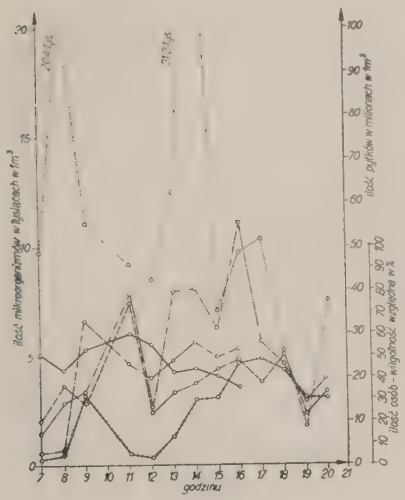
Wykres 6



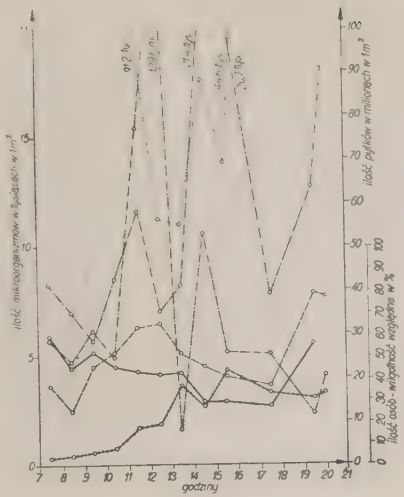
Wykres 7



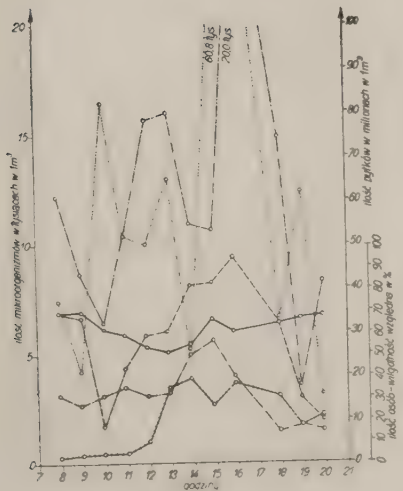
Wykres 8



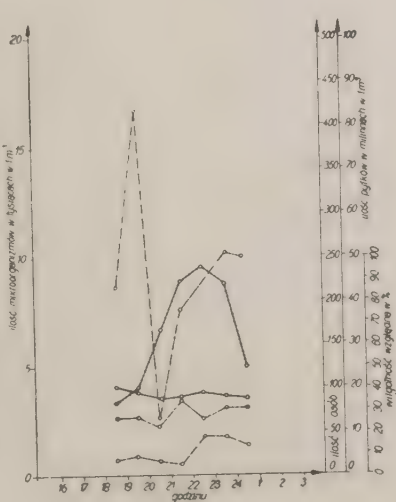
Wykres 9



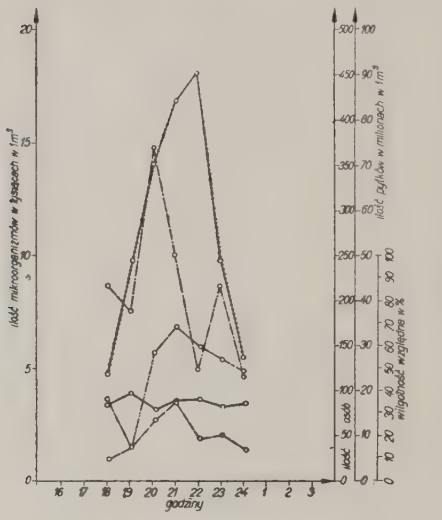
Wykres 10



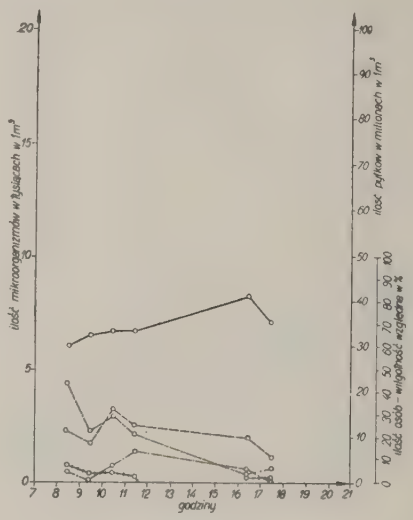
Wykres 11



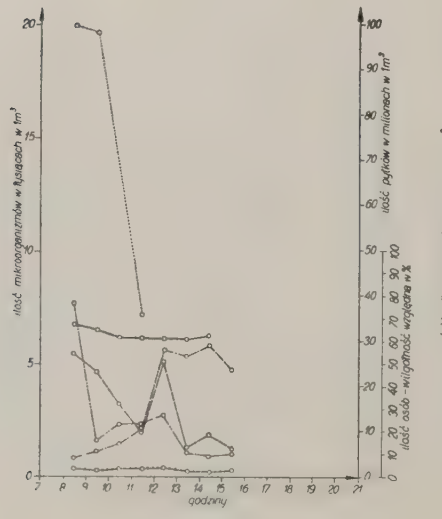
Wykres 12



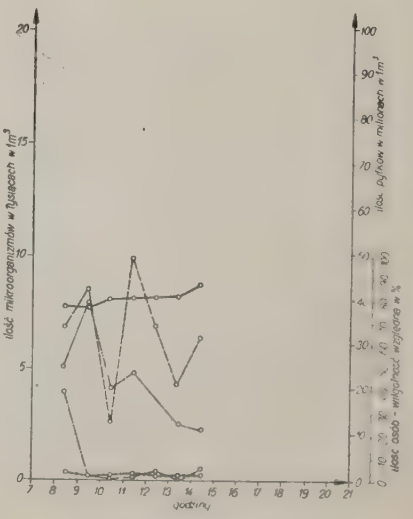
Wykres 13



Wykres 14



Wykres 15



Wykres 16

Tabela

Wyniki badań ilościowych mikroflory powietrza pomieszczeń oraz powietrza atmosferycznego w Warszawie (XI. 1955 - XII. 1956)

Results of the quantitative microbiological examination of indoor and outdoor air in Warszawa City (XI. 1955 - XII. 1956)

Nr badania No of examination	Data badania Date of examination	Miejsce badania Place of examination	Ilość osób w pomieszczeniu (przeciętna min.-max.) Mean and range of number of persons in the room	Powietrze pomieszczeń — Indoor air: Temperatura w °C Temperature (°C)	Ciśn. barom. w mb Barometric pressure (mb)	Wilgotność względna w % przeciętna (min.-max.) Mean and range of percentage relative humidity	Zapylenie w milionach pyłków w 1 m³ przeciętna (min.-max.) Mean and range of dust (millions of particles per cu. m.)	Ilość mikroorganizmów w 1 m³ (na agarze po 48 godz.) Total number of microorganisms per cu. m. (on agar plates after 48 hr incubation) Metoda zderzeniowa przeciętna (A) (min.-max.) Slit sampler counts Mean and range	Metoda sedymentacyjna przeciętna (B) (min.-max.) Open plate counts Mean and range	B A 100	Powietrze atmosferyczne — Outdoor air: Temperatura w °C Temperature (°C)	Ciśn. barom. w mb Barometric pressure (mb)	Wilg. wzgl. w % Relative humidity (per cent)	Opady w mm Precipitation (mm)	Ilość mikroorganizmów w 1 m³ powietrza (na agarze po 48 godz.) Total number of microorganisms per cu. m. (on agar plates after 48 hr incubation) Metoda sedymentacyjna przeciętna (min.-max.) Open plate counts Mean and range
	A. Badania porównawcze Comparative examinations														
1	25. XI. 1955	IHW	3 (1—5)	19,9	1001	79 (74—86)		8960 (1260—69330)	8410 (1150—59870)	93,9	1,2	997,3	82	—	1410 (580 - 3600)
2	27. VI. 1956	PW	2 (1—2)	19,1	1002	57 (52—63)	0,05 (0—0,12)	1230 (750—1850)	1780 (890—3310)	144,7	13,9	1002,0	78	—	4160 (670 - 8730)
	B. Badania w zakładach gastronomicznych. Sale konsumpcyjne Examination in eating houses. Restaurants														
3	3. XII. 1955	C	21 (2—52)	21,4	1007	75 (72—78)		1680 (750—2800)	1840 (730 — 3790)	109,5	3,6	1005,0	88	1,7	
4	8. XII. 1955	C	14 (2—39)	24,0	998	78 (74—86)		2290 (590—6300)	1550 (380 — 4300)	67,2	1,7	988,5	82	0,7	
5	13. I. 1956	A	27 (4—40)	14,0	1002			4540 (2070—7600)	4050 (1020— 6370)	89,2	4,0	996,7	78	2,8	
6	17. I. 1956	D	21 (9—34)	16,8	995	54 (47—71)			6920 (3280—14140)		2,8	993,3	77	0,4	5990 (2990—13760)
7	16. II. 1956	A									8,6	1004,0	87	2,9	1430 (220—2520)
8	10. III. 1956	A									5,1	1008,0	80	0,9	4480 (1660—10640)
9	20. III. 1956	A									3,1	1016,0	69	—	6220 (1620—9970)
10	26. III. 1956	A							*2860 (890—5510)		0,2	1012,0	69	—	7190 (2680—13890)
11	16. IV. 1956	B	35 (4—70)	19,5	1001	61 (57—69)	75,3 (34,2—101,7)	8060 (4000—11400)	13590 (4200—23200)	168,6	9,5	997,0	86	—	10460 (6310—15920)
	16. IV. 1956	B							*9370 (3640—15800)						
12	17. IV. 1956	B							*2990 (1620—4080)		14,0	992,6	71	0,9	17490 (5230—40120)
13	25. IV. 1956	B	29 (3—63)	19,1	999	66 (55—73)	89,6 (2,8—134)	4490 (2580—6930)	5750 (1590—10700)	128,1	5,9	995,8	90	1,9	3460 (1020—11780)
	25. IV. 1956	B							*4410 (2390—7900)						
14	26. IV. 1956	B									9,3	997,3	79	—	20210 (7530—48410)
15	10. V. 1956	C	26 (2—48)	20,1	999	47 (25—60)	20,8 (3,0—35,0)	3750 (2130—7650)	5230 (1600—11080)	139,4	12,0	997,2	71	4,4	10640 (1620—31210)
16	28. V. 1956	A	21 (3—43)	22,9	1007	42 (27—59)	38,7 (7,4—129,6)	5150 (2400—7900)	12980 (5730—21410)	252,0	13,4	1006,0	56		31820 (11660—91210)
17	23. VIII. 1956	A	20 (3—40)	21,4	991	62 (51—70)	17,8 (7,2—28,3)	6630 (1750—9500)	12450 (3500—28000)	187,8	15,8	990,7	83	0,5	14690 (3310—60830)
18	15. XII. 1956	F	160 (80—235)	22,1	—	37 (35—40)	46,9 (13,0—84,0)	1000 (550—1780)	2750 (2170—3410)	275,0	5,8	1001,0	86	0,7	
19	16. XII. 1956	F	279 (117—450)	21,9	—	34 (31—39)	42,7 (24,8—74,4)	1780 (850—3180)	4330 (1240—6850)	242,7	7,2	1007,0	85	—	
	C. Badania w zakładach gastronomicznych. Magazyny Examinations in eating houses. Stores														
20	14. VI. 1956	c	3 (0—6)	21,0	1011	69 (60—83)	3,0 (0,9—7)	2080 (1050—3180)	2090 (480—4430)	100,5	19,9	1008,7	64	—	
21	19. VI. 1956	e	3 (2—3)	21,4	1005	63 (61—67)	17,0 (4,2—29,6)	3020 (1100—5400)	2470 (890—7770)	81,4	18,7	1001,5	72	14,6	15580 (7130—20600)
22	22. VI. 1956	a	3 (1—3)	16,8	1000	80 (76—86)	4,6 (0,5—19,9)	6350 (2480—9800)	4390 (2170—7900)	69,1	13,8	997,4	97	6,9	

* Dane z badań w kuchniach
Examinations in kitchens

wg Omeliańskiego) i metody aspiracyjnej (w szczególności z aparatem Krotowa). Krotow (1953), przeprowadzając badanie efektywności różnych aparatów do pobierania prób powietrza, stwierdził, że metodą sedymentacyjną ujawnia się tylko 30,4% ilości drobnoustrojów wykrywanych jego aparatem. Krotow zaproponował skorygowanie wzoru Omeliańskiego przez założenie, że przy 5 minutach ekspozycji na 100 cm^2 powierzchni płytki osiada ilość mikroorganizmów nie z 10, jak to przyjmował Omeliański, lecz z 3 l powietrza. Zbliżone wyniki uzyskał Włodawiec (1957). Sidorenko (1956) dochodzi do wniosku, że na 100 cm^2 powierzchni płytki w ciągu 5 minut osiada ilość mikroorganizmów z 4 l powietrza. Sidorenko zaznacza jednak, że tego rodzaju przeliczenia można stosować tylko w pomieszczeniach o nieznacznych ruchach powietrza, nie przekraczających kilkudziesięciu cm na sekundę. Turżecki, Oleniewa i Ginzburg (1957) stwierdzają, że w większości wypadków (82,1%) metodą sedymentacyjną wykrywa się dwa razy mniej mikroorganizmów niż aparatem Krotowa. Dianowa (1957) podaje, że metoda sedymentacyjna daje wyniki niższe lub prawie równe ze wskazaniami aparatu Krotowa.

Cytowane dane wykazują, że w pomieszczeniach zamkniętych ilości mikroorganizmów wykrywane metodą sedymentacyjną są mniejsze lub zbliżone do wyników uzyskiwanych metodą zderzeniową. Wyniki naszych badań tylko częściowo są zgodne z powyższymi danymi. Zgodność stwierdzono tylko w badaniach prowadzonych w okresie zimowym w lokalach gastronomicznych dziennych i w pokoju przygotowawczym IHW oraz w okresie letnim w magazynach. W pozostałych badaniach wykrywaliśmy większą ilość mikroorganizmów metodą sedymentacyjną niż metodą zderzeniową. Należy przypuszczać, że niepełna zgodność naszych wyników z cytowanymi danymi wypływa prawdopodobnie z odmiennego charakteru badanych przez nas pomieszczeń. Badane przez nas lokale gastronomiczne charakteryzowały się dużym ruchem osób i na ogół intensywną wymianą powietrza z powietrzem atmosferycznym. Zwiększony ruch osób zwiększa w powietrzu ilość cięższych cząsteczek pyłowych, a tym samym i wyniki uzyskiwane metodą sedymentacyjną. W okresie chłodniejszym dopływ do badanych pomieszczeń czyściejszego pod względem mikrobiologicznym powietrza atmosferycznego obniża wyniki uzyskane metodą sedymentacyjną. W okresie cieplejszym powietrze atmosferyczne zawierające więcej cząsteczek pyłowych powiększa te wyniki. W dnie deszczowe dopływające powietrze atmosferyczne oczyszczające się od cięższych cząstek pyłowych obniża te wyniki. Szczególnie wyraźnie wpływał intensywny ruch osób na zwiększenie wyników uzyskanych metodą sedymentacyjną w porównaniu z metodą zderzeniową w lokalu tanecznym, mimo że badania były

prowadzone w grudniu, a więc w okresie małego mikrobiologicznego zanieczyszczenia powietrza atmosferycznego.

W magazynach gastronomicznych, odwrotnie, na skutek małego ruchu osób wskaźniki metody sedymentacyjnej były mniejsze lub wyrównane w porównaniu ze wskaźnikami metody zderzeniowej. W laboratorium Politechniki Warszawskiej w badaniach prowadzonych w czerwcu ilość mikroorganizmów wykrywana metodą sedymentacyjną była większa niż metodą zderzeniową, pomimo niedużego stosunkowo ruchu osób. Przypuszczać należy, że oddziaływał tu dopływ powietrza atmosferycznego.

Z powyższych wyjaśnień wynika, że przy badaniu mikroflory powietrza pomieszczeń zamkniętych stosunek wskaźników metody sedymentacyjnej do wskaźników metody zderzeniowej zależy w dużym stopniu od intensywności ruchu osób w tych pomieszczeniach oraz od ilości i charakteru dopływającego powietrza atmosferycznego.

Przy badaniach mikroflory pomieszczeń źle wietrzonych wykrywa się w miesiącach letnich mniejsze zanieczyszczenie mikrobiologiczne powietrza niż w miesiącach zimowych (Miller 1933). Nasze badania dały wyniki odmienne: w salach zakładów gastronomicznych w zimie było mniej mikroorganizmów, a w lecie więcej; podczas deszczu ilość mikroorganizmów zmniejszała się. Zjawisko to można również wytłumaczyć dużym wpływem powietrza atmosferycznego na powietrze lokali gastronomicznych, dzięki któremu mikrobiologiczne stosunki ilościowe w lokalach gastronomicznych w poszczególnych sezonach zbliżają się do stosunków panujących w powietrzu atmosferycznym.

W prowadzonych przez nas badaniach ilość mikroorganizmów na ogół wyraźnie się powiększała przy powiększaniu się liczby osób w lokalu, a szczególnie podczas ruchu osób oraz w trakcie sprzątania zakładów. Jest to zgodne z danymi z piśmiennictwa (m. in. Bujwid, 1888; Gąsiorowski, 1908). Także Szafir (1945), przeprowadzając specjalne badania nad zmianą ilości mikroorganizmów w powietrzu podczas przechodzenia przez pokój 10 ludzi, stwierdził, używając wirówki swojej konstrukcji, wzrost ilości mikroorganizmów o 9-12,8%; równoległe badania metodą sedymentacyjną wykazały na ogół wzrost (6,4-166%). Przyłęcka (1952) wykazała również, że liczba drobnoustrojów jest większa tam, gdzie przebywa więcej osób.

W naszych badaniach powietrza krzywe zapylenia często przebiegały podobnie do krzywych zmian ilości mikroorganizmów. Nie stwierdzono jednak ścisłej współzależności między ilością pyłków, pobieranych konimetrem Zeissa a ilością mikroorganizmów. Zależności tej nie stwierdzają Krasnopolski i Choroszanska (1949), pracujący inną metodą. Jest to natomiast niezgodne z dawnymi badaniami Lewisa (1907), który oznaczając ilość opadających z powietrza pyłków i mikroorganizmów, stwierdził prostą zależność między tymi zjawiskami.

W naszych badaniach dziennych nie udało się stwierdzić wyraźnie zależności ilości mikroorganizmów od wilgotności względnej i ciśnienia barometrycznego.

LITERATURA

Bourdillon, R. B., 1948: Studies in air hygiene, London H.M.S.O.

Bugrowa, W. I., 1957: Srawnitielnaja ocenka mietodow baktieriologiczeskogo issledowanija atmosfiernogo wozducha. *Informac. Biul. Inst. San. Gig. im. Erism.*, **9** : 22.

Bujwid, O., 1888: Wyniki poszukiwań bakteryjologicznych nad wodą i powietrzem miasta Warszawy. *Przegl. Lek.*, **27** : 501.

Bujwid, O., 1894: Bakteryje w powietrzu, sposoby badania, znaczenie i opis pospolicie znajdywanych bakteryj. Warszawa. Wyd. E. Kolińskiego.

Dianowa, E. W., 1957: Srawnitielnaja ocenka sedimientacyonnogo i aspiracyonnogo mietodow baktieriologiczeskogo issledowanija atmosfiernogo wozducha. *Informac. Biul. Inst. San. Gig. im. Erism.*, **9** : 16.

Gąsiorowski, N., 1908: Bakteryologiczne badania powietrza w niektórych szkołach miejskich we Lwowie. *Przegląd hyg.*, **7** : 316.

Gogoberidze, R. G., 1953: O primienienii mietoda osiedanija dla koliczestwiennogo mikrobiołogiczeskogo analiza wozducha. *Mikrobiologija*, **22** : 308.

Jakubowska, J., 1954: Mikroflora powietrza — jednym ze wskaźników stanu higienicznego zakładu produkcyjnego. *Przem. Rolny Spoż.*, **8** : 395.

Krotow, J. A., 1953: Nowyj apparat dla mikrobiołogiczeskogo issledowanija wozducha. *Gig. i Sanit.*, **4** : 11.

Krasnopolski, E. M. i Choroszanska, D. I., 1941: K woprosu o mikroflorie wozducha klassnych pomieszczenij. *Gig. i Zdorowje*, **6** : 44.

Lewis, C. J., 1907: The influence of meteorological and other conditions upon the distribution of bacteria in urban atmospheres., *Scot. Med. Surg. J.*, **20** : 487.

Miller, A. A., 1933: Sanitarnaja baktieriołogija. Moskwa. Gos. Med. Izd.

Przyłęcka, J., 1952: Technika bakteriologicznego badania powietrza. *Med. Pracy*, **3** : 177.

Szafir, A. I., 1945: Mikrobiołogiczeskij mietod gigieniczeskogo issledowanija wozducha. Leningrad W.M.M.A.

Szafir, A. I., 1959: Niekotoryje woprosy mietodiki sanitarno-mikrobiołogiczeskich issledowanij wozducha obitajemych pomieszczenij. *Gig. i Sanit.*, **11** : 7.

Sidorenko, G. N., 1956: Gigieniczeskaja charaktieristika baktierialnogo aeroplanktona atmosfiernogo wozducha krupnogo goroda. Autoreferat, Moskwa.

Turżecki, K. I., Oleniewa, E. I., 1957: K mietodikie mikrobiołogiczeskich issledowanij atmosfiernogo wozducha. *Informac. Biul. Inst. San. Gig. im. Erism.*, **9** : 14.

Turżecki, K. I., Oleniewa, E. I., Ginzburg, B. E., 1957: Matieriały k normirowaniju zagriaznienija wozducha pomieszczenij sanitarno-pokazatielnymi mikrobami. *Informac. Biul. Inst. San. Gig. im. Erism.*, **9** : 26.

Wells, W. F., 1955: Aiborne contagion and air hygiene. Cambridge, Harvard Univer. Press.

Włodawiec, W. W., 1957: Srawnitielnaja ocenka mietodow baktieriołogiczeskogo issledowanija wozducha primienitelno k usłowijam zakrytych pomieszczenij. *Gig. i Sanit.*, **1** : 51.

Zacharow, I. I., Łachman, E. I., Tamarina, E. C., Miełkowa, Ł. M., 1954: O stiepieni baktierialnoj obsiemienionnosti wozducha w cechach priedprijatij obszczestwiennogo pitanija. *Gig. i Sanit.*, **1** : 34.

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 323—334

Henryka Kurzepa

EFFECT OF PANTOTHENIC ACID ON *ACETOBACTER XYLINUM*

From the Department of Nutrition, State Institute of Hygiene, Warsaw
Received 1st February 1961

Summary

A. xylinum Ac. 1 in stabilized, optimum conditions produces acetic acid in proportion to the increasing doses of calcium pantothenate and, within accepted limits, it may be used in quantitative assays.

Among the numerous microorganisms for whose growth pantothenic acid or its part is indispensable there are also some species belonging to the *Acetobacter* genus.

The first investigations connected with that problem were carried out by Underkofler, Bantz and Peterson (1943). They stated that *A. suboxydans* requires, for its growth, lactone of pantothenic acid. Sarett and Cheldelin (1945) described method for the quantitative determination of lactone.

Bassalik (1947-1952) showed that a whole molecule of pantothenic acid is indispensable for the growth of. *A. xylinum* produces acetic acid in proportion to certain doses of calcium pantothenate.

Litsky, Esselen, Tepper, and Miller (1953) reported that *A. xylinum* does not require, for its growth, pantothenic acid, and Litsky and Goldman (1953), that *A. xylinum* is even capable of synthesizing that vitamin. However, their results lacked adequate documentation.

It appeared from investigations carried out by Hall, Russel, Tiwari, and Walker, (1953), Hall, Russell, and Tiwari (1954) that other species of *Acetobacter* also require lactone of pantothenic acid for their growth.

In connection with the above mentioned studies regarding the requirements of some *Acetobacter* species for pantothenic acid or its moiety and particularly with Bassalik's research, an idea arose to utilize *A. xylinum* for the quantitative estimation of this compound. The main advantage of this method, apart from others, was the fact that *A. xylinum* may be grown in relatively simple media.

It is necessary only to study the conditions in which *A. xylinum* produces acetic acid in amounts proportional to the concentrations of the calcium pantothenate. In all available literature, no adequate data regarding this problem could be found.

EXPERIMENTAL

The first investigations were conducted by applying Bassalik's medium. The compound of the medium was as follows (in per cent): glucose — 1, asparagine — 0.1, ethanol — 3.0, KH_2PO_4 — 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.03, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0.02, NaCl — 0.03, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0.0014, A-Z solution * — 1 ml/1000 ml of medium.

The medium for the assays was prepared with redistilled water and reagents *pro analysi*. The quantity of the medium in each kind of test flasks was so adjusted as to maintain the proper relationship between the surface of the medium and its volume within the limits 1 : 1. The cultures were incubated at 28°C.

The amount of acetic acid produced during the incubation was measured by titrating with 0.1 N sodium hydroxide. The results were expressed in percentages of acetic acid. Each of the results is an average of 3-9 parallel repetitions.

CHOISE OF STRAIN

Three strains were assayed. They came respectively from:

1. Museum of Warsaw University; Chair of Plant Physiology and General Microbiology. This strain was isolated from vinegar and assayed by Orłowska (1953),

2. Museum of Łódź Polytechnic School; Chair of Technical Microbiology. This strain was isolated from wort and marked as *A. xylinum Ac. 1*, **

3. the strain was isolated from the „Japanese fungus" by the author of this paper and determined according to Bergey (1957). Completing tests were carried out according to Henneberg (1926) and Orłowska (1953).

* 1 litre of A-Z solution contains (in grams): $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ — 0.5, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ — 7.0, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ — 1.0, LiCl — 0.5, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$—1.0, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$—1.0, H_3BO_4— 11.0, $Al_2(SO_4)_3$ — 1.0, $Co(NO_3) \cdot 6H_2O$ — 1.0, TiO — 1.0, KJ — 0.5, KBr — 0.5, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 0.5.

** The author expresses her thanks for the strain given to her by Prof. Jadwiga Jakubowska.

It was ascertained that all the three strains produced acetic acid in amounts proportionate to the increasing doses of calcium pantothenate (Diagram I).

The largest amount of acetic acid, in the same period of time, was produced by the strain *A. xylinum Ac. 1.* When applying this strain the range of differences between parallel assays for each dose of calcium pantothenate were smallest (below 10%). That is why this strain has been finally chosen for further research.

OPTIMUM CONDITIONS FOR CULTURES

Effect of the concentration of calcium pantothenate. In the preliminary experiments doses of calcium pantothenate ranging from 0.005 to 0.2 μg, per ml of the medium were applied. The results obtained are presented in Diagram II.

As appears from Diagram II, within the range of the concentrations of calcium pantothenate, from 0.005 to 0.08 μg ml, the production of acetic acid increases proportionately. The minimum dose of calcium pantothenate is bellow 0.005 μg (compare K u r z e p a, 1956).

Further experiments dealt with the determination of such concentrations of calcium pantothenate in which the proportions of this substance concentration and the production of acetic acid were most prominent. The most regular curves within the limits of the calcium pantothenate concentrations, ranging between 0.0025 and 0.02 g (per ml of medium), were obtained after a 3-day incubation. This is illustrated by Diagram III.

Effect of ethanol concentration. According to O r ł o w s k a (1953) *A. xylinum* can grow in the concentration of ethanol up to 8 per cent. Bassalik applied in his research work over *A. xylinum* a 3-per cent ethanol.

In this work, ethanol was applied in concentrations of 3, 4, and 5 per cent in order to find out at which amount the relationship between acetic acid and calcium pantothenate concentrations would be the best.

It appears from the experiments that if the concentration of ethanol in the medium varies from 3 to 4 per cent, *A. xylinum* produces acetic acid in similar quantities. A 5-per cent concentration of ethanol reduces the production of this acid, determined in identical periods of incubation (Diagram IV). A proportional dependence between the added calcium pantothenate and the production of acid is to be noticed in all concentrations of ethanol applied.

Considering the cost of the medium, the application of media containing 3-per cent ethanol seems most relevant.

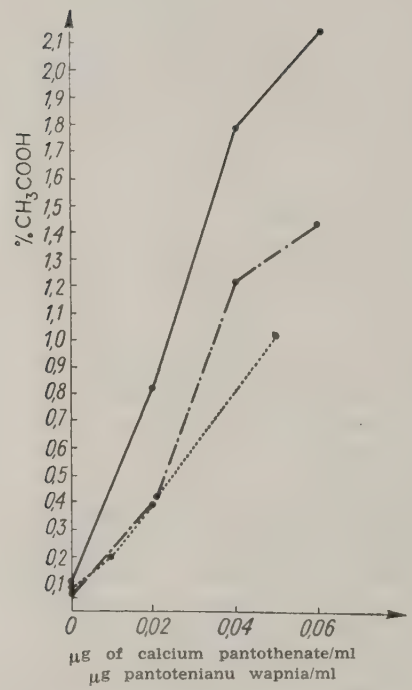


Diagram I: Effect of calcium pantothenate on production of acetic acid by three strains of *A. xylinum*

Diagram I: Wpływ kwasu pantotenowego na wytwarzanie kwasu octowego przez trzy szczepy *A. xylinum*

———— strain isolated from wort
szczep wyizolowany z brzeczki
—·—·—·— strain isolated from „Japanese fungus"
szczep wyizolowany z grzybka japońskiego
..... strain isolated from vinegar
szczep wyizolowany z octowni

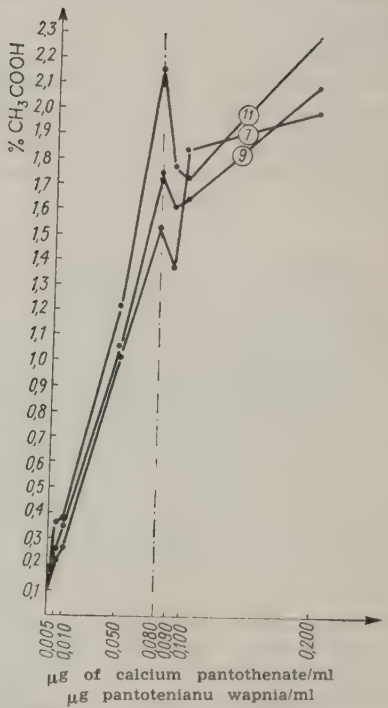


Diagram II: Response of *A. xylinum* to calcium pantothenate (doses from 0.005 to 0.2 µg/ml)

Diagram II: Wpływ pantotenianu wapnia w granicach od 0.005 do 0.2 µg/ml na wytwarzanie kwasu octowego przez *A. xylinum*

Figures in circles denote days of culture

Cyfry w obwódkach oznaczają dni hodowli

Effect of glucose concentration. Various authors, among others Hall, Thomas, Tiwari, and Walker (1953) used 2 or 3 per cent concentrations of glucose in media for acetic acid bacteria.

It was found in this work that if the amounts of glucose are 1, 2, 3, and 4 per cent the production of acetic acid is intensive and proportional to the increasing doses of calcium pantothenate. If the concentration of glucose drops to 1 per cent, the production of acetic acid is reduced, but it is still proportional (Diagram V).

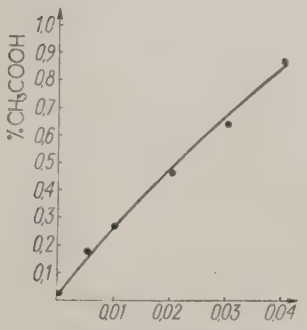


Diagram III: Response of *A. xylinum* to calcium pantothenate (doses from 0.0025 to 0.02 µg/ml)

Diagram III: Wpływ pantotenianu wapnia w granicach od 0,0025 do 0,02 µg/ml na wytwarzanie kwasu octowego przez *A. xylinum*

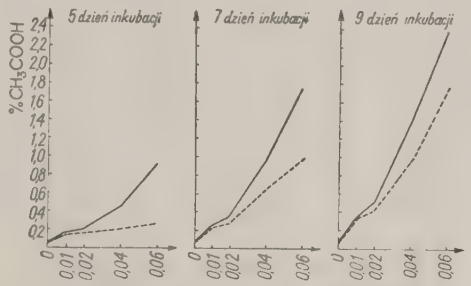


Diagram IV: Effect of different concentrations of ethanol on response of *A. xylinum* to calcium pantothenate

Diagram IV: Wpływ różnych stężeń etanolu na produkcję kwasu octowego przez *A. xylinum* w zależności od pantotenianu wapnia

———— 4 } per cent of ethanol
— — — — 5 } procent etanolu

The seeming discrepancies between the amount of acetic acid produced by *A. xylinum* in a medium containing 1 per cent of glucose (Diagrams I and V) are due to the use of different culture flasks and i. e., different strata of the medium. In the experiment illustrated by Diagram I, the volume of the medium amounted to 50 ml (500 ml flasks), and in the experiments illustrated by Diagram V — only to 2 ml (25 ml flaks). It is well-known that the thickness of the medium layer has an effect on the percentage of the acetic acid produced in the same time and an identical medium (Prescott and Dunn, 1952).

Effect of various sources of nitrogen. According to Bergeys (1957) *A. xylinum* is unable to grow on ammonium nitrogen. On the other hand Rao and Stokes (1953) reported that this microorganism can grow in a medium containing ammonium sulphate. The medium used by them differed considerably from that applied in this work.

The behaviour of *A. xylinum* was examined in the following sources of nitrogen: $(NH_4)_2SO_4$, $NH_4H_2PO_4$, and NH_4Cl, glycine (Stokes and Larsen, 1945) as well as in asparagine 0.1, 0.2, 0.5 per cent.

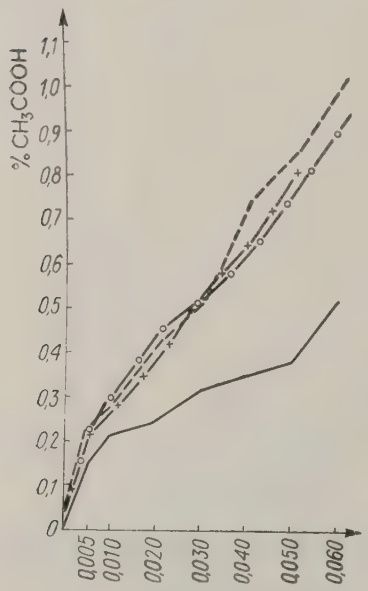


Diagram V: Effect of different concentrations of glucose on response of *A. xylinum* to calcium pantothenate

Diagram V: Wpływ różnych stężeń glikozy na produkcję kwasu octowego przez *A. xylinum* w zależności od pantotenianu wapnia

1
o — o 2
3
4
per cent of glucose
procent glikozy

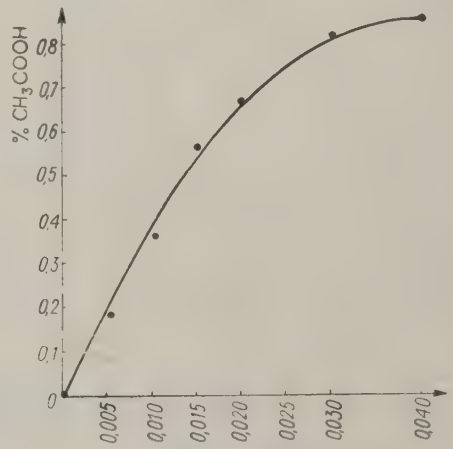


Diagram VI: Response of 2-day culture of *A. xylinum* to calcium pantothenate

Diagram VI: Wpływ 2-dniowej hodowli *A. xylinum* na zależność między ilością wytworzonego kwasu octowego a dodanym pantotenianem wapnia

Inoculum prepared of basal medium with calcium pantothenate 0.04 µg/ml

Zawiesinę do szczepień sporządzono z hodowli na pożywce podstawowej z dodatkiem pantotenianu wapnia w ilości 0,04 µg/ml pożywki

The inorganic sources of nitrogen were added to the medium in amounts equal as to their content of nitrogen in 0.1 per cent of asparagine. All the experiments were carried out at the same time with the same *pH* of media after sterilization. The results obtained in the experiments are presented in Table I.

Table I

Effect of the different sources of nitrogen on production of acetic acid by *A. xylinum* (the dose of calcium pantothenate = 0.05 μg/ml)
Wpływ różnych źródeł azotu na produkcję kwasu octowego przez *A. xylinum* (dawka pantotenianiu wapnia = 0.05 μg/ml)

Source of nitrogen Źródło azotu	Days of culture — Dni hodowli			
	5	6	7	8
	% CH_3COOH			
$(NH_4)_2SO_4$	0.138	0.226	0.342	0.399
$NH_4H_2PO_4$	0.129	0.223	0.317	0.393
NH_4Cl	0.188	0.292	0.349	0,421
glycine	—	—	—	—
asparagine (%)				
0,1	0.141	0.377	0.851	1.059
0,2	0.185	0.556	0.917	1.106
0,5	0.163	0.342	0.569	0.726

Effect of *pH* value. According to data provided by Hestrin and Schramm (1954) optimum *pH* for the growth of *A. xylinum* is about 5.5.

The investigations concerning the use of calcium pantothenate by some acetic acid bacteria have shown that in media with *pH* = 6.2 the growth of some of them is strongest. In the case of *A. suboxydans*, Hall, Russell, and Tiwari (1954) did not state any growth differences in media with *pH* = 5.0-6.2. Moreover, the data supplied by Adrian (1959) show that pantothenic acid, in media whose acidity ranged from 5.5 to 6.0, was not destroyed by a short heating at temperature of 120°C.

In this connection, experiments were carried out to elucidate the effect of various *pH* on the production of acetic acid by *A. xylinum* within the limits of calcium pantothenate concentrations settled in this paper.

It was found that *A. xylinum* produced acetic acid in proportion to the increasing doses of calcium pantothenate within *pH* range from 4.7 to 6.1, while the largest quantity of acetic acid was obtained, in the same time, in media with *pH*, after sterilization, ranging from 5.5 to 6.0.

Method for the sterilization of media. The media were sterilized by filtering them through Seitz's filters, they were heated thrice up to 100°C for 30 min. and they were autoclaved at 0.7 atm pressure for 10 min. One may draw the conclusion that none of the mentioned sterilizing methods destroys calcium pantothenate. During the further investigation the media containing this vitamin were autoclaved at 0.7 atm pressure for 10 min. Analogical methods are used in the sterilization of media applied in microbiological assays of vitamins and aminoacids, especially when small volume of media are used (Hall, Russell and Tiwari, 1953; Kurzepa and Trzebska-Jeske, 1958).

Effects of the size and age of inoculum. In the initial experiments, the medium was inoculated with the suspension from a 2-3 days, culture of *A. xylinum* on a slant agar with wort. The inocula prepared in this way contained every time another number of cells.

In order to obtain a more uniform and free of cellulose scraps inoculum, the bacteria were grown on a basal medium supplemented by 0.04 μg of calcium pantothenate per 1 ml of medium.

Flat-bottomed tubes (1.9 × 7.0 cm) contained each 5 ml of medium, owing to which the pellicle of *A. xylinum* growth has an uniforms surface. The medium was inoculated with the loopful of a young agar culture. A visible growth, in the shape of a pellicle appeared on the surface of the medium on the second day of the incubation.

The inoculum was prepared in the following manner: the pellicle was removed from a 2-6-day culture, aseptically transferred to a flask with glass beads containing about 10 ml of salt solution and stirred for 2 or 3 minutes. The suspension was centrifugated to separate the unbroken scraps of cellulose. The supernatant liquid was centrifugated once more. The sediment of the cells was washed by repeated centrifugation in 5 ml of saline. The washed cells were finally suspended in 5 ml of saline.

Measurements of optical density, in Beckman's apparatus at the wave lenght of 650 milimicrons have shown that the inoculum prepared in this way contains each time the same number of cells. The optical density of the inoculum prepared in the above described way was of the order 0.140-0.200, independent of the age of the culture (2-11 days).

Further experiments ascertained the effect of the age of an *A. xylinum* culture (2-18 days) on the course of the standard curve, representing the dependence between the quantity of the produced acetic acid and the increasing doses of calcium pantothenate. The series of the media were inoculated with the suspensions obtained in the above described way

and directly from the slant agar. The Diagrams VI, VII, VIII show the possibility of using *A. xylinum* cultures 2-18 days old.

This statement is of great practical value in the methods for the quantitative assays of pantothenic acid.

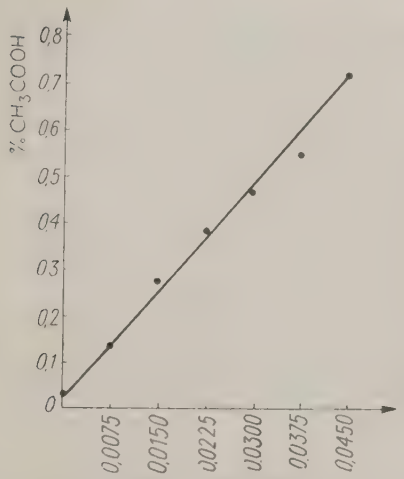


Diagram VII: Response of 4-day slant agar-wort culture of *A. xylinum* to calcium pantothenate

Diagram VII: Wpływ 4-dniowej hodowli *A. xylinum* na skosie agarowym z brzeczką na zależność między ilością wytworzonego kwasu octowego a dodanym pantotenianem wapnia

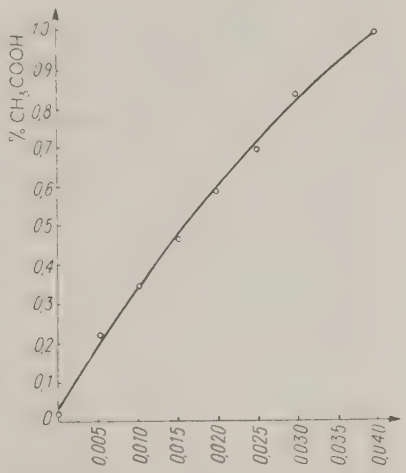


Diagram VIII: Response of 18-day slant agar-wort culture of *A. xylinum* to calcium pantothenate

Diagram VIII: Wpływ 18-dniowej hodowli *A. xylinum* na skosie agarowym z brzeczką na zależność między ilością wytworzonego kwasu octowego a dodanym pantotenianem wapnia

CONCLUSIONS

1. *A. xylinum* is an auxotrophic species in relation to pantothenic acid. All the strains of *A. xylinum* under examination, isolated from vinegar, wort and „Japanese fungus", displayed proportionality in the production of acetic acid to the increasing doses of calcium pantothenate within the range of concentrations from about 0.0025 to 0.08 µg of this vitamin per ml of the medium. The limits of the calcium pantothenate concentrations, from 0.0025 to 0.02 µg/ml of the medium were accepted for the quantitative assays.

2. When examining the effect of some ingredients of the medium on the percentage quantity of acetic acid produced by *A. xylinum* it was found that the most prominent dependence between the production of acetic acid and the content of calcium pantothenate is obtained in a medium containing 3 per cent of ethanol, 2 per cent of glucose and 0.2 per cent of asparagine.

3. *A. xylinum* can grow on inorganic compounds of nitrogen: NH_4Cl, $NH_4H_2PO_4$ and $(NH_4)_2SO_4$. However, it does not grow on nitrogen in the form of glycine.

4. *A. xylinum* produces acetic acid in amounts proportional to the calcium pantothenate concentrations, within the *pH* range 4.7 - 6.1, while the graetest quantity of acetic acid is produced at *pH* equal to 5.5.

5. For the study of relationship between the content of calcium pantothenate and the production of acetic acid, an inoculum prepared from the culture 2-18-days old can be used.

6. It appears from the above that *A. xylinum* could be applied as a test organism for the quantitative assays of pantothenic acid.

The autor expresses her cordial thanks for the possibility of carrying out of this work in the State Institute of Hygiene, to Prof. Dr. Aleksander Szczygieł, Chief of Nutrition Department.

LITERATURE

Adrian, J., 1959: Le dosage microbiologique des vitamines du groupe B. *Ann. Nutr. Alm.*, **13** : 1

Bassalik, K., 1947-1952: personal communication.

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957, Baltimore.

Henneberg, W., 1926: Handbuch der Gärungsbakteriologie.

Hestrin, S., Schramm, M., 1954: Synthesis of cellulose by *A. xylinum.* 2. Preparation of freeze-dried cells capable of polymerizing glucose to cellulose. *Bioch. J.*, **58** : 345.

Hall, A. N., Thomas, G. A., Tiwari, K. S., Walker, T. K., 1953: Nutrition of *Acetobacter* species. *Arch. Biochim. Biophys.*, **46** : 485.

Hall, A. N., Russel, C., Tiwari, K. S., 1954: The response of certain *Acetobacter* species to the lactone moiety of pantothenic acid. *J. Bact.*, **68** : 279.

Kurzepa, H., 1956: *Acetobacter xylinum* jako ilościowy wskaźnik kwasu pantotenowego. *Acta Microbiol. Polon.*, **5** : 1.

Kurzepa, H., Trzebska-Jeske, I., 1958: Mikrobiologiczna metoda ilościowego oznaczania aminokwasów wg Hendersona i Snella z własnymi modyfikacjami. *Roczn. P. Z. H.*, **9** : 497.

Litsky, W., Esselen, W. B. Jr., Tepper, B., Miller, G., 1953: Nutritive requirements of *Acetobacter.* I. Vitamin requirements of *Acetobacter xylinum. Food Res.*, **18** : 250.

Litsky, W., Goldman, C. L., 1953: The nutritive requirements of *Acetobacter.* II. The vitamin synthesis of *Acetobacter xylinum. Food Res.*, **18** : 646.

Orłowska, K., 1953: Ocena użyteczności produkcyjnej bakterii octowych na podstawie badań gatunków wyizolowanych z octowni polskich. *Przem. Roln. Spoż.*, **7** : 126.

Prescott, S., Dunn C., 1952: Tiechniczeskaja mikrobiołogija. Moskwa. (Russ. transl.).

Rao, R. M. R., Stokes, I. L., 1953: Nutrition of the acetic acid bacteria. *J. Bact.*, **65** : 4.

Sarett, H. P., Cheldelin, V. H., 1945: The use of *Acetobacter suboxydans* for assay of the lactone moiety of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **159** : 311.

Stokes, J. W., Larsen, A., 1945: Amino acid requirements of *Acetobacter suboxydans*. *J. Bact.*, **49** : 495.

Underkofler, L. A., Bantz, A. C., Peterson, W. H., 1943: Growth factors for bacteria. XIV. Growth requirements of *A. suboxydans*. *J. Bact.*, **45** : 183..

Henryka Kurzepa

WPŁYW KWASU PANTOTENOWEGO NA *ACETOBACTER XYLINUM*

Streszczenie

Praca miała na celu zbadanie możliwości zastosowania *A. xylinum* do ilościowych oznaczeń kwasu pantotenowego.

W związku z tym przeprowadzono doświadczenia mające za zadanie dobór odpowiedniego szczepu testowego, określenia granic wzrastających dawek pantotenianiu wapnia i ustalenia optymalnych warunków hodowli (badano wpływ różnych stężeń etanolu, glikozy, asparaginy, oraz wpływ innych źródeł azotu niż asparagina; ponadto określono optimum *pH*, sposób wyjaławiania pożywek oraz wielkość i wiek zawiesiny do szczepień).

Stwierdzono, że *A. xylinum Ac. 1* w ustalonych optymalnych warunkach wytwarza kwas octowy w stosunku proporcjonalnym do zwiększających się dawek pantotenianu wapnia w granicach przyjętych w tej pracy i może być wykorzystany do ilościowych oznaczeń tej witaminy.

Author's address:
Adres autora:
Dr H. Kurzepa,
Państwowy Zakład Higieny,
Warszawa, Chocimska 24,
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 335—338

Mirosław Fiuczek

POWSTAWANIE DŁUGICH KOMÓREK *ESCHERICHIA COLI* POD WPŁYWEM KWASU *β*-INDOLOOCTOWEGO I KWASU MALONOWEGO

Z Katedry Fizjologii Roślin Uniwersytetu Warszawskiego
Wpłynęło dnia 1 marca 1961 r.

Streszczenie

Stwierdzono istnienie zależności między pobieraniem tlenu i tworzeniem się form wydłużonych *E. coli* a obecnością kwasu β-indoolooctowego i malonowego.

METODYKA

Do doświadczeń użyto szczepu *E. coli* ze zbiorów Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. Skład pożywki był następujący: glikoza 2% , pepton produkcji krajowej 1% , woda wodociągowa; *pH* początkowe pożywki 6,8. Bakterie hodowano w probówkach ze szkła jenajskiego. Bakterie użyte do doświadczeń przeszczepiano uprzednio trzy razy co drugi dzień, hodując je na pożywce o wymienionym składzie w temperaturze 32°. Do doświadczeń używano kwasu β-indoolooctowego firmy E. Merck i kwasu malonowego p. a. krajowej produkcji. W doświadczeniach z kwasem β-indoolooctowym i kwasem malonowym do probówki dawano 8 ml pożywki, 1 ml 22-godzinnej kultury *E. coli*, odpowiednią ilość kwasu β-indoolooctowego lub kwasu malonowego i dopełniano wodą sterylizowaną do objętości 10 ml. Probówki kontrolne nie zawierały dodatku badanych kwasów. Obserwacje mikroskopowe wykonywano po 24 godzinach inkubacji. Pomiary pobierania tlenu przez bakterie wykonywano przy pomocy aparatu Warburga. Naczyńko reakcyjne zawierało 0,9 ml pożywki, 0,3 ml roztworu wodnego kwasu β-indoolooctowego lub kwasu malonowego odpowiedniego stężenia i 0,3 ml 22-godzinnej kultury *E. coli*. Dla pochłaniania CO_2 dodawano 0,2 ml 20% KOH i skrawek bibuły. W kontroli zamiast kwasu β-indoolooctowego lub kwasu malonowego dawano 0,3 ml wody sterylizowanej. Wszystkie pomiary wykonywano w 3 powtórzeniach w temperaturze 32°.

DOŚWIADCZENIA I WYNIKI

Stosowano następujące stężenia kwasu *β*-indoolooctowego w hodowli: 1000, 100, 10 i 1 μg ml. Przy stężeniu kwasu *β*-indoolooctowego 1000 μg ml

komórki bakterii posiadały wymiary jak komórki w kontroli i były przeważnie pozlepiane w grudki. Wzrost bakterii był zahamowany. Przy stężeniu 100 μg/ml komórki bakterii były przeciętnie dwa razy dłuższe niż w kontroli; wzrost hodowli był dość obfity, ale słabszy niż w kontroli. Przy stężeniu 10 μg/ml rozmiary bakterii i wzrost hodowli były podobne do stwierdzonych w kontroli. Następne doświadczenie wykonano, stosując stężenia kwasu β-indolooctowego w hodowli 100-1000 μg/ml (w odstępach co 100μg). Wyniki uzyskane w stężeniu 100 μg ml kwasu β-indolooctowego potwierdziły rezultaty doświadczenia wstępnego. W stężeniu 200 μg ml komórki były dwa lub kilka razy dłuższe niż w kontroli; wzrost hodowli był tylko nieznacznie słabszy niż w stężeniu 100 μg ml. Przy stężeniach wyższych, aż do 1000 μg ml, komórki posiadały wymiary jak w kontroli i były przeważnie pozlepiane w grudki; wzrost hodowli był bardzo zahamowany.

Doświadczenie z kwasem malonowym przeprowadzono w stężeniach: 1000, 100, 10 i 1 μg ml. W 1000 μg/ml komórki posiadały wymiary jak w kontroli i były pozlepiane w grudki; wzrost hodowli był bardzo zahamowany. W stężeniu 100 μg/ml bakterie były przeciętnie o połowę dłuższe niż w kontroli; wzrost hodowli był trochę słabszy niż w kontroli. W stężeniu 10 i 1 μg ml długość komórek i wzrost hodowli nie różnił się od stwierdzonego w kontroli. Doświadczenie z kwasem malonowym powtórzono, stosując stężenia 100-1000 μg ml (w odstępach co 100 μg). W stężeniach 100 i 200 μg/ml komórki bakterii były przeciętnie o połowę dłuższe niż w kontroli; wzrost hodowli był prawie tak obfity jak w kontroli. W stężeniach 300 i 400 μg ml komórki były przeciętnie dwa i trzy razy dłuższe niż w kontroli; wzrost hodowli był słabszy niż w kontroli. W stężeniach 500 i 600 μg ml komórki bakterii były przeciętnie o połowę dłuższe niż w kontroli, a liczne z nich zlepione były w grudki; wzrost hodowli był słabszy niż w kontroli. W stężeniach 700-1000 μg ml rozmiary komórek nie różniły się od kontrolnych; komórki były pozlepiane w grudki. Wzrost hodowli był silnie zahamowany.

Pobieranie tlenu przez *E. coli* zmierzono, stosując kwas β-indolooctowy i kwas malonowy w stężeniach powodujących wydłużanie komórek i nie wywierających wpływu na rozmiary bakterii. Przeprowadzono również pomiary kontrolne bez dodatku kwasów. Wyniki doświadczeń przedstawiono w tabelach I i II.

W stężeniu 140 μg ml kwasu β-indolooctowego w hodowli pobieranie tlenu przez komórki *E. coli* jest zahamowane w porównaniu z kontrolą. Komórki wyrastające w tym stężeniu były dwa a nawet kilka razy dłuższe od rozwijających się w kontroli. W kontroli pobieranie tlenu stale wzrastało, a ilość komórek bakterii powiększyła się. Przy stężeniu kwasu β-indolooctowego 14 μg ml pobieranie tlenu jest zbliżone

Tabela I

Pobieranie tlenu przez komórki *Escherichia coli* w obecności kwasu β-indolooctowego i w kontroli przy temperaturze 32°

Oxygen uptake by *Escherichia coli* in the presence of β-IAA

Czas w min. Time min.	µl pobranego tlenu w przedziałach 30-minutowych								
	kwas β-indolooctowy						kontrola		
	140 µg/ml			14 µg/ml					
30	5,167	4,335	6,235	7,580	8,818	7,988	7,035	7,960	6,706
60	5,167	5,780	4,988	18,192	20,155	18,876	22,512	21,227	20,119
90	3,875	4,335	3,741	24,256	23,934	24,012	25,326	22,554	22,802
120	3,875	2,890	4,988	34,868	28,973	30,546	33,768	29,187	28,167
150	3,875	4,335	3,741	40,932	46,609	42,327	42,210	43,781	45,604
180	5,167	4,335	3,741	68,220	71,803	69,942	73,164	74,295	75,112
210	3,875	4,335	3,741	90,960	88,179	90,245	94,269	88,889	89,867
240	5,167	5,780	4,988	121,280	115,832	118,437	115,374	118,076	118,034

Tabela II

Pobieranie tlenu przez komórki *Escherichia coli* w obecności kwasu malonowego i w kontroli przy temperaturze 32°

Oxygen uptake by *Escherichia coli* in the presence of malonate

Czas w min. Time in min.	µl pobranego tlenu w przedziałach 30-minutowych								
	kwas malonowy						kontrola		
	430 µg/ml			43 µg/ml					
30	7,664	8,760	7,122	7,855	8,939	10,188	10,749	8,068	10,869
60	10,730	8,760	9,971	20,947	20,433	19,102	21,499	22,860	16,304
90	9,197	10,220	9,971	27,493	28,096	29,290	37,623	36,307	36,685
120	9,197	10,220	9,971	41,894	39,580	40,752	47,029	49,754	46,193
150	10,730	8,760	8,547	56,295	54,915	54,760	63,153	65,890	62,500
180	9,197	8,760	8,547	69,387	67,688	68,764	80,622	75,958	80,163
210	9,197	10,220	9,971	77,243	76,626	73,863	96,746	92,784	96,467
240	10,730	8,760	9,971	108,663	108,553	106,974	114,214	116,989	112,772

do stwierdzonego w warunkach kontroli. W tym stężeniu kwasu β-indolooctowego, po zakończeniu pomiarów pobierania tlenu, nie stwierdzono w naczynkach reakcyjnych długich komorek *E. coli*. Wpływ kwasu malonowego na pobieranie tlenu przez komorki *E. coli* ma podobny charakter. W stężeniu 430 µg ml kwasu malonowego pobieranie tlenu przez komórki *E. coli* jest zahamowane w porownaniu z pobieraniem tlenu w kontroli. W stężeniu tym wyrosły komórki dwa i kilka razy dłuższe niż w kontroli. W stężeniu 43 µg ml pobieranie tlenu przez komorki *E. coli* jest zbliżone do stwierdzonego w kontroli; wielkosc komorek jest taka jak w kontroli.

Mirosław Fiuczek

FORMING OF LONG-CELLS IN *ESCHERICHIA COLI* IN THE PRESENCE OF β-IAA AND MALONIC ACID

Summary

Experiments on the action of β-indolylacetic acid and malonic acid on the development of long cells of the *Escherichia coli* were made. Observations of the *E. coli* cells after 24-hour incubation at 32°C in various concentrations of the β-indolyacetic acid and malonic acid in controls were conducted.

Measurements of the oxygen uptake by the *E. coli* cultures in Warburg apparatus at the concentrations 140 μg/ml, 14 μg/ml of the β-indolylacetic acid, 430 μg/ml, 43 μg/ml of the malonic acid and in controls were conducted (Tables I and II).

Oxygen uptake and the development of long cells of *E. coli* are correlated.

At the concentrations 140 μg/ml of the β-indolylacetic acid or 430 μg/ml of the malonic acid appeared cells twice and several times as long as in controls, and the oxygen uptake was diminished compared to controls.

Adres autora:
Author's address:
Dr M. Fiuczek,
Katedra Mikrobiologii Uniwersytetu Warszawskiego,
Warszawa, Nowy Świat 67,
POLSKA

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA
1961, 10 : 339—346

Danuta Kulińska

WPŁYW DŻDŻOWNIC NA MIKROFLORĘ GLEBY

Z Katedry Mikrobiologii Rolnej Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie

Wpłynęło dnia 10 marca 1961 r.

Streszczenie

Wykonano szereg analiz ilościowych mikroflory zawartej w treści przewodu pokarmowego dżdżownic, świeżych odchodach oraz glebie, w której hodowano dżdżownice. Analizy nie ujawniły bezpośredniego wpływu odchodów dżdżownic na mikroflorę gleby. Stwierdzono wzrost ilości drobnoustrojów w odchodach przechowywanych w glebie przez 13 dni. Najsilniejszy wzrost stwierdzono 3 dnia.

WSTĘP

Na znaczenie dżdżownic w procesach glebotwórczych zwrócił uwagę po raz pierwszy Darwin. Szereg późniejszych prac podkreśla rolę dżdżownic w procesie wytwarzania próchnicy glebowej.

W obszernej już dziś literaturze dotyczącej dżdżownic dość dużo miejsca poświęca się badaniom nad zmianami, jakim może podlegać mikroflora i mikrofauna glebowa w czasie wędrówki gleby przez przewód pokarmowy dżdżownic. Bassalik (1913 cyt. wg Daya, 1950), wyizolował z przewodu pokarmowego dżdżownic *Lumbricus terrestris* ponad 50 gatunków bakterii, nie znajdując jednak różnic jakościowych między florą bakteryjną gleby, z której pochodziły dżdżownice, a mikroflorą przewodu pokarmowego. Aichberger (1914 cyt. wg Satchella, 1958), nie znalazł w przewodzie pokarmowym dżdżownic żywych okrzemek, glonów, drożdży i korzenionóżek. Day (1950) prowadził badania ilościowe mikroflory gleby i świeżych odchodów dżdżownic i nie znalazł między nimi stałych różnic.

Praca niniejsza jest próbą określenia składu ilościowego mikroflory gleby, w której hodowano dżdżownice, treści przewodu pokarmowego

i świeżych odchodów oraz określenia mikrobiologicznych zmian ilościowych zachodzących w czasie kilkudniowego przechowywania odchodów.

METODYKA

Doświadczenia prowadzono w wazonach szklanych zawierających około 7 kg gleby. Glebę do wszystkich doświadczeń pobierano z pola majątku doświadczalnego SGGW w Jaktorowie. Przed rozpoczęciem doświadczenia dżdżownice przechowywano w badanej glebie przez 24 godziny w celu zastąpienia treści przewodu pokarmowego glebą badaną. Do wazonu z glebą wpuszczano około 30 dżdżownic. W dniu założenia doświadczenia określano wilgotność gleby i utrzymywano ją na nie zmienionym poziomie przez czas trwania doświadczenia. Dżdżownice pozostawały w glebie 4 doby. Po wyjęciu z gleby dokładnie przemywano je wodą wodociągową, a następnie wodą jałową. Część dżdżownic umieszczano w szalkach Petriego i po upływie 4-5 godz. zbierano nagromadzone odchody i przygotowywano rozcieńczenia. Dżdżownice przeznaczone do preparowania usypiano, działając 2-3 minut eterem etylowym. Naważkę dla przygotowania rozcieńczeń przygotowywano z treści odcinka przewodu pokarmowego 4 dżdżownic, od żołądka do otworu odbytowego. Preparowanie dżdżownic i odważanie próbki przeprowadzono w sposób zabezpieczający przed zakażeniem. Ogólną ilość drobnoustrojów oznaczano metodą płytkową. Dla każdego rozcieńczenia przeznaczano 6 płytek równoległych. Ogólną ilość drobnoustrojów i odsetek drobnoustrojów w stanie przetrwalnym (po 10 minutach ogrzewania w 75°) określano na agarze odżywczym. Kolonie liczono po 24 i 48 godzinach. Ilość grzybów określano na agarze odżywczym zakwaszonym 10-procentowym kwasem solnym do *pH* 4,5. Kolonie grzybów liczono po 72 godzinach. Ilość promieniowców oznaczano na agarze skrobiowym. Kolonie liczono po 10 dniach. Ilość drobnoustrojów rosnących na podłożu bezazotowym określano po 5 dniach inkubacji na pożywce bezazotowej z mannitolem i solami. Ponadto określano: miano drobnoustrojów nitryfikujących I fazy na pożywce wg Winogradskiego. Obecność azotynów sprawdzano po 2 tygodniach inkubacji, stosując odczynnik Griessa; miano drobnoustrojów celulolitycznych tlenowych na pożywce płynnej wg Dubosa z paskami bibuły filtracyjnej. Wyniki odczytywano po 14 dniach; miano drobnoustrojów celulolitycznych beztlenowych na pożywce płynnej z siarczanem amonu i paskami bibuły. Pożywkę rozlewano do wysokich probówek (30 cm) i zalewano parafiną w celu zmniejszenia dopływu tlenu. Wyniki odczytywano po 4 tygodniach hodowli; miano drobnoustrojów amonifikujących na bulionie mięsnym z dodatkiem 2% peptonu na podstawie zniebieszczenia papierka lakmusowego zawieszonego pod korkiem. Wyniki odczytywano po upływie 5 dni; miano drobnoustrojów denitryfikujących w wysokich słupach pożywki agaryzowanej z glukozą i azotanem potasu. Pożywkę po zaszczepieniu zalewano 10 cm warstwą agaru wodnego. Wskaźnikiem obecności drobnoustrojów denitryfikujących było wytwarzanie gazu. Wyniki odczytywano po 8 dniach hodowli; miano drobnoustrojów beztlenowych rosnących na podłożu, do którego nie dodawano związków azotowych, określano w wysokich słupach pożywki agaryzowanej z sacharozą i fosforanem potasu. Po zaszczepieniu pożywkę zalewano warstwą agaru wodnego. Obecność drobnoustrojów przyjmowano za wykazaną na podstawie gazowania. Wszystkie hodowle inkubowano w temperaturze 28°. Na każde rozcieńczenie przeznaczano 5 powtórzeń.

Dla określenia zmian ilościowych zachodzących w czasie przechowywania odchodów dżdżownic zbierano świeże odchody do małych woreczków (6 × 4 cm) z gazy młyńskiej i zakopywano do gleby umieszczonej w szklanym wazonie. Przez czas

trwania doświadczenia utrzymywano wyjściowy stopień wilgotności gleby. Odchody do analizy pobierano po 3, 6, 10 i 13 dniach. Równocześnie przeprowadzano analizę mikrobiologiczną gleby przylegającej bezpośrednio do woreczków i gleby kontrolnej.

Używane w doświadczeniach dżdżownice określono na podstawie cech zewnętrznych jako *Lumbricus terrestris*.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Przeprowadzono łącznie 11 analiz ilościowych. Każda analiza obejmowała równocześnie mikroflorę gleby, w której hodowano dżdżownice, treści przewodu pokarmowego i świeżych odchodów dżdżownic. Badania prowadzono w terminach: IX-X 1958, I-IV 1959, VI-VII 1960 r. Część wyników zebrano w tabeli I.

Zmiany ogólnej ilości drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym i w świeżych odchodach dżdżownic, w porównaniu z glebą, w której przebywały dżdżownice, wahają się w dużych granicach, od zmniejszenia o 90% do zwiększenia o 570%. Podobnie ilość grzybów i promieniowców nie ulega równomiernemu zwiększeniu czy zmniejszeniu w porównaniu z glebą. Spośród 11 przeprowadzonych analiz, w 6 przypadkach stwierdzono zwiększenie odsetka drobnoustrojów występujących w stanie przetrwalnym w przewodzie pokarmowym, w 4 zaś tylko przypadkach w odchodach. Bardziej zgodne wyniki uzyskano przy określaniu drobnoustrojów rosnących na podłożu bez dodatku związków azotowych w warunkach tlenowych. Na 11 przeprowadzonych analiz tylko w analizie 2, 6 i 11 wyniki wskazują na zwiększenie ilości tych drobnoustrojów w treści przewodu pokarmowego lub w odchodach w porównaniu z glebą. W pozostałych analizach ilość tych drobnoustrojów ulega zmniejszeniu od 3 do 82%.

Miano bakterii nitryfikacyjnych w glebie, treści przewodu pokarmowego i w świeżych odchodach waha się w granicach 10^{-3}-10^{-4}. Podobne wyniki otrzymano przy określaniu miana pozostałych grup fizjologicznych bakterii. Graniczne rozcieńczenia, w których stwierdzono w poszczególnych analizach obecność bakterii amonifikujących, wynoszą 10^{-4}-10^{-6}, denitryfikujących i rosnących na podłożu bez dodatku związków azotowych — 10^{-3}-10^{-5}. Miano bakterii celulolitycznych tlenowych i rosnących przy zmniejszonym dostępie tlenu leży w granicach 10^{-2}-10^{-5}. W porównaniu z glebą miano wymienionych grup bakterii zwiększa się lub zmniejsza z reguły o dziesięciokrotne rozcieńczenie lub utrzymuje na tym samym poziomie jak w glebie.

Otrzymane wyniki, zgodne z wynikami Daya, nie wskazują na istnienie stałych różnic między ilością drobnoustrojów występujących w glebie, przewodzie pokarmowym i świeżych odchodach dżdżownic. Brak sta-

Tabela I

Ilość drobnoustrojów w glebie, treści przewodu pokarmowego i odchodach dżdżownic

Nr analizy Analysis No	Ilość drobnoustrojów w tysiącach w 1 g s.m.					
	Ogólna ilość drobnoustrojów* Total			Grzyby Fungi		
	a	b	c	a	b	c
1	3 600 (27,6)	24 100 (68,0)	14 000 (15,6)	9,50	17,00	10,50
2	4 700 (33,9)	16 500 (9,0)	12 000 (21,3)	10,60	16,10	10,00
3	5 700 (20,6)	9 300 (11,0)	10 600 (17,5)	3,40	21,50	18,00
4	9 000 (10,1)	5 800 (28,7)	4 000 (18,5)	2,80	4,40	0,29
5	3 000 (33,3)	3 200 (78,1)	5 100 (31,2)	5,50	2,20	2,50
6	2 900 (60,7)	3 000 (68,0)	4 700 (36,4)	2,00	0,70	2,30
7	2 800 (50,0)	10 500 (14,9)	5 700 (59,8)	0,28	0,14	0,34
8	3 500 (18,3)	2 700 (16,8)	1 050 (66,2)	4,60	4,30	6,50
9	12 400 (16,3)	6 300 (46,5)	2 000 (10,0)	—	—	—
10	3 200 (38,0)	3 400 (38,4)	2 400 (40,0)	1,40	7,70	1,70
11	3 200 (26,5)	4 300 (40,0)	4 000 (25,3)	—	—	—

a — gleba
b — treść przewodu pokarmowego
c — odchody

łego, jednolitego kierunkowo wpływu dżdżownic na populacje mikrobiologiczne gleby może być wynikiem działania wielu czynników wpływających na stan fizjologiczny poszczególnych osobników i ich aktywność. Zmniejszanie ilości drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym dżdżownic w porównaniu z glebą może zachodzić jako skutek trawienia drobnoustrojów przez dżdżownice. Szereg prac wskazuje, że tak zhumifikowane resztki organiczne, jak i żywe organizmy pobierane z glebą przez dżdżownice, mogą stanowić dla nich pokarm. Stöckli (1958) uważa, że dżdżow-

* — w nawiasach podano % drobnoustrojów w stanie przetrwalnym
** — tą nazwą obejmowano drobnoustroje rosnące na podłożu bez dodatku związków azotowych
*** — w analizie 1-7 ilości promieniowców nie oznaczano

Viable count in soil, intestine of earthworm and its excrements

Viable count, thousands per 1 g d. m.					
Oligonitrofile** Oligonitrophilic			Promieniowce*** Streptomycetes		
a	b	c	a	b	c
17 900	9 500	13 000	—	—	—
11 500	20 000	133 200	—	—	—
9 800	9 000	6 300	—	—	—
13 800	7 400	6 800	—	—	—
6 300	4 200	4 700	—	—	—
4 300	3 400	6 500	—	—	—
10 600	6 100	10 200	—	—	—
12 600	7 000	5 500	820	1 040	880
18 000	7 400	5 000	2 900	1 900	1 900
14 800	14 300	10 700	1 300	1 900	1 080
8 100	8 600	5 500	2 200	2 970	5 500

a — soil
b — intestine
c — excrementa

nice, a szczególnie *Lumbricus terrestris*, odgrywają ważną rolę jako pożeracze edafonu. Day stwierdził również zmniejszanie ilości *Serratia marcescens* w odchodach dżdżownic w porównaniu z glebą. Mogłoby to świadczyć o trawieniu tych drobnoustrojów w czasie wędrówki gleby przez przewód pokarmowy. Ruschman (1953) z ekskrementów dżdżownic wyizolował szczepy promieniowców antybiotycznych w stosunku do bakterii gramdodatnich oraz szczepy szczególnie aktywne w stosunku do azotobaktera. I ten czynnik może wpływać na zmniejszenie

* — in parenthesis per cent of spores
** — microorganisms growing on media without nitrogen source added
*** — not examined in analysis 1—7

ilości drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym. Wypowiadane są i inne poglądy: Musierowicz (1949) referuje, że gleba po przejściu przez przewód pokarmowy dżdżownic ulega wzbogaceniu w bakterie i grzyby. Parle (1959), omawiając wyniki uzyskiwane przez różnych autorów, zwraca uwagę na wyraźne sprzeczności i stwierdza, że nie ma podstaw do wyciągania ogólnych wniosków na temat wpływu dżdżownic na mikroflorę gleby. W świetle wyników własnych, rozpatrywanych na tle danych z literatury, wydaje się uzasadnione przypuszczenie, że bezpośredni wpływ dżdżownic na mikroflorę gleby zależy od stanu fizjologicznego poszczególnych osobników, m. in. od tego, czy w przewodzie pokarmowym procesy trawienia drobnoustrojów górują nad procesami rozmnażania, czy też dzieje się odwrotnie. Trzeba tu również podkreślić, że zarówno badania własne, jak i referowane, mają charakter jedynie wycinkowy. Ograniczony zestaw podłoży użytych do analizy nie stwarzał bowiem warunków dla ujawnienia wszystkich grup drobnoustrojów, które mogą występować w przewodzie pokarmowym dżdżownic.

Tabela II

Zmiany ilości drobnoustrojów w czasie przechowywania odchodów
Effect of storage of earthworm excrementa on the number of microorganisms

Kolejny dzień przechowywania odchodów Day of storage	Ilość drobnoustrojów w tysiącach w 1 g s. m. Viable count, thousands per 1 g d. m.								
	Ogólna ilość drobnoustrojów* Total			Grzyby Fungi			Promieniowce Streptomycetes		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	6 000 (10,2)	6 000 (10,2)	1 000 (66,2)	12,5	12,5	6,5	930	930	870
3	4 500 (28,6)	7 500 (21,1)	72 000 (8,2)	6,6	8,4	24,0	570	660	150
6	5 500 (16,7)	13 800 (22,0)	23 000 (30,0)	1,5	1,9	3,0	780	790	360
10	7 400 (20,3)	9 500 (20,8)	44 900 (9,8)	1,6	7,4	1,9	2 100	770	320
13	6 500 (43,4)	7 700 (41,2)	22 800 (12,6)	3,7	7,3	0,96	3 600	3 300	3 500

a — gleba kontrolna — control soil
b — gleba przylegająca do woreczków z odchodami — soil adhering to excrementa
c — odchody — excrementa

* — w nawiasach podano % drobnoustrojów w stanie przetrwalnym — in parenthesis per cent of spores

Wyniki zebrane w tabeli II wskazują, że ogólna ilość drobnoustrojów wyraźnie wzrasta w czasie przechowywania odchodów w glebie. Najsilniejszy wzrost otrzymano 3 dnia. W ciągu następnych dni ilość drobnoustrojów zmniejsza się, niemniej nadal znacznie przekracza ilości ujawnione w glebie. Podobnie wzrasta ogólna ilość drobnoustrojów w glebie otaczającej woreczki z odchodami. Wzrost waha się w granicach 18-151%. Ilość bakterii w stanie przetrwalnym wysoka w świeżych odchodach w porównaniu z glebą (gleba 10%, odchody 66%) zmniejsza się w ciągu kilku dni o 10-30% (z wyjątkiem analizy wykonanej 6 dnia, gdzie otrzymano wzrost form przetrwalnych o 13% w porównaniu z glebą). Ilość grzybów, podobnie jak ogólna ilość drobnoustrojów, we wszystkich analizach z wyjątkiem ostatniej wzrasta w porównaniu z glebą. Ilość promieniowców w czasie przechowywania odchodów ulega zmniejszeniu w granicach od 3 do 73%.

Namnożenie drobnoustrojów w odchodach jest możliwe ze względu na zmiany fizykochemiczne, jakie w nich zachodzą. Odchody dżdżownic już częściowo zhumifikowane, wg Lunta i Jacobsona (1944) zawierają więcej azotu, substancji organicznych, wapnia, fosforu i innych składników, wykazują wyższą wilgotność i *pH* niż otaczająca gleba. Tak przerobiona gleba o dobrej, gruzełkowatej strukturze może stanowić doskonałe podłoże dla rozwoju bakterii. Powyższe wyniki dają prawo do wysunięcia poglądu o pośrednim wpływie dżdżownic na kształtowanie się stosunków ilościowych w mikroflorze gleby.

Kierownikowi Katedry doc. A. Drozdowiczowi za dobór tematu, pomoc i cenne wskazówki składam serdeczne podziękowanie.

LITERATURA

Day, G. M., 1950: Influence of earthworms on soil microorganisms. *Soil sci.*, **69** : 175.

Darwin, Ch., 1904: The formation of vegetable mould. London.

Lunt, H. A., Jacobson, H. G. M., 1944: The chemical composition of earthworm casts. *Soil sci.*, **58** : 367.

Musierowicz, A., 1949: Organizmy glebowe. Warszawa, PIWR.

Parle, J. N., 1959: Activities of micro-organisms in soil and the influence on these of the soil fauna. Rothamsted Experimental Station. Extract: 1.

Ruschman, G., 1953: Über Antibiosen und Symbiosen von Bodenorganismen und ihre Bedeutung für die Bodenfruchtbarkeit. *Z. Acker. PflBau.*, **97** : 101.

Satchell, J. F., 1958: Earthworm biology and soil fertility. *Soil and fert.*, **21** : 209.

Stöckli, A., 1958: Die Regenwurmarten in landwirtschaftlich genutzten Böden des schweizerischen Mittellandes. *Landwirtsch. Jahrbuch der Schweiz.*, **72(7)** : 699.

Danuta Kulińska

EFFECT OF EARTHWORM ON SOIL MICROFLORA

Summary

Number of microorganisms was studied in intestine of earthworm, its excrementa and in soil, in which earthworms were living. By routine plate method total number of microorganisms, number of bacterial spores, of fungi, streptomycetes, and oligonitrophilic microorganisms were examined. Number of nitryfying, denitryfying, amonificators, cellulolytic (aerobic and anaerobic) bacteria were examined by dilution technique. No stable effect of earthworms on soil microflora was noted. It was shown that number of microorganisms increased during the storage of earthworm excrementa in soil. This increase was the most prominent on the third day of storage.

Adres autorki:
Author's address:
Mgr D. Kulińska
Katedra Mikrobiologii Rolnej SGGW,
Warszawa, Rakowiecka 8,
POLSKA

SPIS TREŚCI — CONTENTS

1. L. Janota-Bassalik and D. Pedyk: Ability of *Flavobacterium extorquens* Bassalik to utilize various sources of carbon with particular reference to glucose
Zdolność do wykorzystania różnych źródeł węgla ze szczególnym uwzględnieniem glikozy przez *Flavobacterium extorquens* Bassalik . . . 225
2. L. Janota-Bassalik and K. Pyrka: Optimum conditions for the utilization of oxalates by *Flavobacterium extorquens* Bassalik
Optymalne warunki zużywania szczawianów przez *Flavobacterium extorquens* Bassalik 239
3. R. Pakuła: Interspecific transformation as a means of determining genetic relationships in streptococci
Analiza pokrewieństwa genetycznego w obrębie rodzaju *Streptococcus* i *Pneumococcus* metodą międzygatunkowej transformacji 249
4. A. Drozdowicz: Investigations on cellulose decomposition by myxobacteria from the genus *Sporocytophaga*
Badania nad rozkładem błonnika przez miksobakterie z rodzaju *Sporocytophaga* 255
5. J. Niewiarowska: Morphologie et physiologie des *Actinomycetes* symbiotiques des *Hippophae*
Morfologia i fizjologia promieniowców symbiotycznych *Hippophae* . . 271
6. K. Danilewicz: Badania nad zdolnością niektórych szczepów *Streptomyces* do wywoływania parcha zwykłego ziemniaka i buraka
Studies on the ability of some *Streptomyces* strains to cause the scab in potato and sugar-beet 287
7. L. Bożko, K. Cypryk-Ossowska i B. Krzysztofik: Mikroflora powietrza zakładów gastronomicznych i powietrza atmosferycznego miasta Warszawy (cz. I. Badania ilościowe)
Microflora in restaurants air and atmospheric air of Warszawa (p. I. Quantitative examinations) 307
8. H. Kurzepa: Effect of pantothenic acid on *Acetobacter xylinum*
Wpływ kwasu pantotenowego na *Acetobacter xylinum* 323
9. M. Fiuczek: Powstawanie długich komórek *Escherichia coli* pod wpływem kwasu β-indolooctowego i kwasu malonowego
Forming of long-cells in *Escherichia coli* in the presence of β-IAA and malonic acid 335
10. D. Kulińska: Wpływ dżdżownic na mikroflorę gleby
Effect of earthworm on soil microflora 339

Warunki prenumeraty kwartalnika

ACTA MICROBIOLOGICA POLONICA

Cena w prenumeracie zł 100,— rocznie
zł 50,— półrocznie

Zamówienia i wpłaty przyjmują:

1. Centrala Kolportażu Prasy i Wydawnictw „Ruch", Warszawa, ul. Srebrna 12, konto PKO nr 1-6-100020
2. Urzędy pocztowe
3. Księgarnie „Domu Książki"

Prenumerata ze zleceniem wysyłki za granicę 40% drożej. Zamówienia dla zagranicy przyjmuje Przedsiębiorstwo Kolportażu Wydawnictw Zagranicznych „Ruch", Warszawa, ul. Wilcza 46, konto PKO nr 1-6-100-024.

Bieżące numery do nabycia w księgarniach naukowych „Domu Książki" oraz w Ośrodku Rozpowszechniania Wydawnictw Naukowych Polskiej Akademii Nauk — Wzorcownia Wydawnictw Naukowych PAN — Ossolineum — PWN, Warszawa, Pałac Kultury i Nauki (wysoki parter).

Tylko prenumerata zapewnia regularne otrzymywanie czasopisma

Cena zł 25,—

Wydawane z zasiłku
POLSKIEJ AKADEMII NAUK